

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA hSTAUFEN 1
EN PROCESOS DE REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN,
DIFERENCIACIÓN NEURONAL E INFECCIÓN POR EL
VIRUS DE LA GRIPE**

Tesis Doctoral

**Joan Peredo Hernández
Abril, 2013**

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA hSTAUFEN 1 EN
PROCESOS DE REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN,
DIFERENCIACIÓN NEURONAL E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE
LA GRIPE**

Memoria presentada por Joan Peredo Hernández para
optar al título de Doctor

Madrid, Abril de 2013

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de los Dres. Juan Ortín Montón y Susana de Lucas Arias.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias al disfrute de una beca pre-doctoral de Formación de Personal investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Als meus pares

A la meva germana

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| SUMMARY | 7 |
| ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1-EL CICLO DE VIDA DEL RNA MENSAJERO | 19 |
| 1.1 Regulación del mRNA en el núcleo | 19 |
| 1.1.1 Transcripción | 19 |
| 1.1.2 <i>Capping</i> | 19 |
| 1.1.3 <i>Splicing</i> | 20 |
| 1.1.4 Poliadenilación | 20 |
| 1.1.5 mRNA <i>Editing</i> | 21 |
| 1.1.6 Transporte de las mRNPs | 21 |
| 1.2 Regulación del mRNA en el citoplasma | 21 |
| 1.2.1 Traducción del mRNA | 22 |
| 1.2.2 Represión y degradación del mRNA | 22 |
| 1.2.2.1 El complejo RISC | 22 |
| 1.2.2.2 miRNAs: Biogénesis y función | 23 |
| 1.3 <i>Decapping</i> y deadenilación | 24 |
| 1.4 Degradación mediada por exonucleasas 5'→3' o 3'→5' | 25 |
| 1.5 Degradación mediada por endonucleasas | 26 |
| 1.5.1 <i>Non-stop</i> (NSD) y <i>Non-go mediated decay</i> (NGD) | 26 |
| 1.5.2 <i>Non-sense mediated decay</i> (NMD) | 26 |
| 1.5.3. <i>Staufen mediated decay</i> (SMD) | 26 |
| 1.6 Gránulos de represión, degradación y transporte de RNA | 27 |
| 1.6.1 Gránulos de células germinales | 27 |
| 1.6.2 Gránulos de estrés | 27 |
| 1.6.3 <i>Processing Bodies</i> | 29 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.6.4 Gránulos de transporte | 29 |
| 2-LA PROTEÍNA hStaufen1 | 30 |
| 2.1 Antecedentes | 30 |
| 2.2 Staufen1 y los gránulos de RNA | 31 |
| 2.3 Staufen1 y su implicación en diferenciación neuronal y plasticidad sináptica | 33 |
| 2.4 Implicación de hStaufen1 en infecciones virales | 33 |
| 2.4.1 hStaufen1 y virus de la gripe | 33 |
| 2.4.2 hStaufen1 y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) | 34 |
| 3-VIRUS DE LA GRIPE | 34 |
| 3.1 La partícula viral | 34 |
| 3.2 El RNA viral | 36 |
| 3.2.1 vRNAs o RNAs genómicos | 36 |
| 3.2.2 cRNAs o RNAs complementarios | 37 |
| 3.2.3. mRNAs o RNAs mensajeros | 37 |
| 3.3 El ciclo de infección | 37 |
| 3.3.1 Entrada del virus en la célula | 37 |
| 3.3.2 Transcripción y replicación | 38 |
| 3.3.3 Traducción | 39 |
| 3.3.4 Morfogénesis, ensamblaje y liberación de nuevas partículas | 39 |
| OBJETIVOS | 41 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 45 |
| 1-MATERIALES BIOLÓGICOS | 47 |
| 1.1 Líneas celulares | 47 |
| 1.2 Estirpes Bacterianas | 47 |
| 1.3 Virus | 47 |
| 1.4 Plásmidos | 47 |
| 1.5 Anticuerpos | 48 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2-MÉTODOS | 49 |
| 2.1 Manipulación de DNA y clonajes | 49 |
| 2.1.1 Construcción de un plásmido lentiviral silenciador del gen hStaufen1 | 49 |
| 2.2 Análisis de cultivos celulares | 50 |
| 2.2.1 Mantenimiento de cultivos celulares | 50 |
| 2.2.2 Transfecciones celulares | 50 |
| 2.3 Técnicas virológicas | 51 |
| 2.3.1 Infecciones virales | 51 |
| 2.3.2 Generación de <i>stocks</i> de virus de gripe | 51 |
| 2.3.3 Titulación de virus mediante ensayo en placa | 51 |
| 2.3.4 Curvas de crecimiento viral | 52 |
| 2.3.5 Generación de lentivirus | 52 |
| 2.3.6 Purificación de viriones | 52 |
| 2.4 Diferenciación de células SHSY5Y | 53 |
| 2.5 Análisis de la longitud y el número de las dendritas de células SHSY5Y | 53 |
| 2.6 Análisis de RNAs | 53 |
| 2.6.1 Extracción de RNA total | 53 |
| 2.6.2 Extracción de RNA de los complejos purificados | 54 |
| 2.6.3 RT-PCR | 54 |
| 2.6.3.1 TaqMan de miRNAs | 54 |
| 2.6.3.2 RT-qPCR semicuantitativa | 54 |
| 2.6.4 Análisis transcriptómico | 55 |
| 2.6.5 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) | 55 |
| 2.7 Análisis de proteínas | 56 |
| 2.7.1 Obtención de extractos citoplasmáticos | 56 |
| 2.7.2 Purificación de la proteína etiquetada con TAP | 56 |
| 2.7.3 <i>Western Blot</i> | 57 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.4 Cromatografía de exclusión molecular | 57 |
| 2.7.5 Microscopia confocal de inmunofluorescencia | 57 |
| 2.8 Silenciamiento génico | 58 |
| 2.8.1 Silenciamiento mediante siRNAs | 58 |
| 2.8.2 Silenciamiento mediante transducción lentiviral | 59 |
| RESULTADOS | 61 |
| 1. ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS DE HSTAUFEN1 | 63 |
| 1.1 Asociación de proteínas del RISC a los complejos de hStaufen1. | 63 |
| 1.1.1. Análisis de la Interacción de las proteínas del RISC con los complejos de hStaufen1 | 63 |
| 1.1.2 Colocalización de las proteínas del RISC con los complejos de hStaufen1 | 64 |
| 1.2 Análisis de los RNAs asociados al complejo | 66 |
| 1.2.1 mRNAs asociados al complejo | 66 |
| 1.2.2 miRNAs asociados al complejo de hStaufen1 | 68 |
| 1.2.2.1 Identificación de la asociación de miRNAs maduros | 68 |
| 1.2.2.2 Selección de los miRNAs potencialmente más relevantes | 69 |
| 1.2.2.3 Análisis de los 6 miRNAs seleccionados en células de neuroblastoma humano | 70 |
| 1.2.2.4 Comparación de la asociación de los 6 miRNAs seleccionados a los complejos de hStaufen1 en células SHSY5Y con respecto al extracto inicial celular | 71 |
| 1.2.2.5 Análisis de miR-124 durante la diferenciación neuronal | 72 |
| 2-PAPEL DE hSTAUFEN1 EN DIFERENCIACIÓN NEURONAL | 74 |
| 2.1 Generación de una línea estable de neuroblastoma humano silenciable para hStaufen1 | 75 |
| 2.1.1. Generación de vectores lentivirales capaces de silenciar hStaufen1 inducibles por doxiciclina | 75 |
| 2.1.2 Silenciamiento inducible de hStaufen1 por doxiciclina | 76 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.1.3 Construcción de una línea estable de células de neuroblastoma humano silenciable para hStaufen1 | 77 |
| 2.2 Análisis fenotípico celular | 79 |
| 2.2.1 Tasa de crecimiento celular | 79 |
| 2.2.2 Análisis de los fenotipos celulares durante la cinética de diferenciación <i>in vitro</i> | 80 |
| 2.2.3 Análisis dendrítico de neuroblastos diferenciados silenciados | 81 |
| 3- IMPLICACIÓN DE hSTAUFEN1 EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE | 84 |
| 3.1 Análisis de la interacción de los complejos hStaufen1 con RNPs reconstituidas del virus de la gripe | 84 |
| 3.2 Interacción de hStaufen1-TAP con cada elemento de la RNP | 86 |
| 3.3 La proteína hStaufen1 participa en la correcta formación de viriones del virus de la gripe | 87 |
| 3.4 Relocalización de hStaufen1 durante la infección por el virus de la gripe | 89 |
| DISCUSIÓN | 93 |
| 1-CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE hSTAUFEN1 EN LA CÉLULA. | 95 |
| 1.1 La proteína hStaufen1 forma parte de complejos de represión de la traducción mediada por miRNAs | 95 |
| 1.2 Mecanismo de unión de mRNAs al complejo de hStaufen1 | 96 |
| 1.3 Diferente eficiencia en la asociación de miRNAs a los complejos de hStaufen1 | 97 |
| 1.4 Más importante que el “cómo”, es el “cuándo” | 97 |
| 2-PAPEL DE hSTAUFEN1 EN DIFERENCIACIÓN DE NEUROBLASTOS HUMANOS | 98 |
| 2.1 Múltiples funciones para un proceso altamente regulado | 99 |
| 2.2 ¿Podría hStaufen1 ser un factor causante de enfermedades mentales? | 101 |
| 2.3 El sistema de silenciamiento inducible como alternativa | 102 |
| 3-PAPEL DE hSTAUFEN1 DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE | 102 |
| 3.1 Interacción con las vRNPs | 102 |

| | |
|------------------------------------------------------|------------|
| 3.2 Transporte de las vRNPs hasta la membrana | 103 |
| 3.3 Morfogénesis de nuevos viriones | 104 |
| CONCLUSIONES | 105 |
| BIBLIOGRAFÍA | 109 |
| ANEXOS | 133 |
| Anexo 1. Tabla suplementaria | 134 |
| Anexo 2. Publicaciones | 137 |

Summary

Human Staufen1 is a double-stranded RNA-binding protein that forms ribonucleoprotein complexes about 6 to 10 MDa in size and has been involved in the transport and localized translation of mRNAs. Furthermore, it is associated to the rough endoplasmic reticulum and polysomes and interacts with proteins that participate in different pathways of mRNA repression or decay.

In the work presented here, we have analysed its implication in the miRNA-mediated repression of translation. hStaufen1 interacts with the AGO family of proteins and their complexes contain not only mRNAs but also a set of 17 miRNAs, which target some of the detected mRNAs. A more efficient association was found for miR-124 both in HEK293T cells and the human neuroblastoma cell line SHSY5Y. The analysis of endogenous hStaufen1 complexes during *in vitro* differentiation of human neuroblast cells revealed an alteration of the balance between hStaufen1 isoforms and a redistribution of miR-124 to smaller cellular complexes.

To analyse the implication of hStaufen1 in neuronal differentiation we have constructed a stable neuroblastoma cell line in which the expression of hStaufen1 protein can be downregulated by adding doxycycline to the media. This biological tool allowed us to demonstrate a role of hStaufen1 in the branching of dendrites during *in vitro* neuroblastoma cell differentiation.

Finally, to analyze the role of hStaufen1 in the infection of influenza virus, we infected human pulmonary epithelial cells in which hStaufen1 was downregulated. The yield of influenza virus infections was reduced more than 10 times in the various hStaufen1-silenced cells as compared to control cells. The expression levels of viral proteins and their nucleo-cytoplasmic transport were not affected upon hStaufen1 silencing but virus particle production, as determined by purification of virions from supernatants, was reduced. Furthermore, at late times in virus infection, hStaufen1 underwent a relocalization into a perinuclear region, close to the MTOC complex and to the endoplasmic reticulum. These results indicate a role for hStaufen1 in late events of the influenza virus infection, possibly in the vRNP transport to the plasma membrane.

Abreviaturas y Anglicismos

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| A: Adenina | eIF: Factor de iniciación de la traducción eucariota |
| A549: Células epiteliales de carcinoma de pulmón humano | EJC: Complejo de las uniones entre exones |
| AG: Aparato de Golgi | FMRP: Proteína del síndrome del X frágil |
| AGO: Argonauta | G: Guanina |
| AMP: Adenosin monofosfato | GCG: Gránulos de células germinales |
| AR: Ácido retinoico | H: Hora |
| ARE: Secuencia AAUAAA | HA: Hemaglutinina |
| ATCC: American Type Culture Collection | HBS: HEPES <i>buffered saline</i> |
| ATP: Adenosina trifosfato | HEK293T: Células embrionarias de riñón humano |
| BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro | hnRNP: Partícula ribonucleoproteica heterogénea |
| C: Citidina | h.p.i: Horas post-infección |
| CamKαII: Calmodulin Kinasa alfa II | kDa: KiloDalton |
| CAP: 7-metil-guanosina y el primer nucleótido del mRNA | Lipid raft: Balsa lipídica |
| capping: Adición de la estructura CAP | M1: Proteína de matriz 1 del virus de la gripe |
| cDNA: DNA complementario | M2: Proteína de matriz 2 del virus de la gripe |
| CI: Compartimentos intermedios | MDa: Mega Dalton |
| Cm: Centímetro | MDCK: Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby |
| CMV: Citomegalovirus | MDI: Multiplicidad de infección |
| cDNA: DNA complementario | mg: Miligramo |
| cRNA: RNA complementario | miRNAs: MicroRNAs |
| cRNP: Ribonucleoproteína intermedio de la replicación de banda positiva del virus de la gripe | ml: Mililitro |
| CTD: Dominio carboxilo terminal | mRNA: RNA mensajero |
| dbAMPc: Dibutiril AMPc | MTOC: Centro organizador de microtúbulos |
| decapping: Hidrólisis de la estructura CAP | NA: Neuraminidasa |
| DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium | nCBC: Complejo nuclear de unión a CAP |
| dsRNA: RNA de doble cadena | |
| EDTA: Ácido etilendiaminotetra-acético | |

NEP: Proteína de exportación nuclear del virus de la gripe

NGD: *Non-go mediated decay*

nM: Nano Molar

NMD: Non-sense mediated decay

NP: Nucleoproteína

NS1: Proteína no estructural 1 del virus de la gripe

NSD: *Non-stop mediated decay*

nt: Nucleótido

PA: Proteína ácida del virus de la gripe

PABP: Proteína de unión a poliA

PABPC: Proteína citosólica de unión a poliA

PABPN: Proteína nuclear de unión a poliA

PAP: Polimerasa de poliadenilación

PB: *Processing bodies, P-Bodies*

PB1: Proteína básica 1 del virus de la gripe

PB2: Proteína básica 2 del virus de la gripe

PBS: Tampón fosfato salino

PBSc: Tampón fosfato salino completo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

poliA: Cola de adeninas

pre-miRNA: Segundo precursor de miRNAs

pre-mRNA: Precursor de mRNAs

pri-miRNA: Producto de la transcripción de miRNAs

RBD: *Ribosome binding domain*

tRFP: *turbo Red fluorescent protein*

RISC: *RNA-induced silencing complex*

RNA: Ácido ribonucleico

RNAPII: RNA polimerasa tipo II

RNP: Ribonucleoproteína

Rpm: Revoluciones por minuto

SAB: Seroalbúmina bovina

SDS: Dodecil sulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SG: Gránulos de estrés

shRNA: Horquilla corta de RNA de doble cadena

siRNA: RNA interferente

SHSY5Y: Línea celular de neuroblastoma humano

Shut off: Proceso por el cual se inhibe la expresión de los mRNAs celulares durante la infección viral.

SMD: Staufen mediated decay

snRNPs: Partícula ribonucleoproteica de bajo peso molecular

Spliceosoma: Complejo que contiene la maquinaria de splicing

Splicing: Procesamiento del pre-RNA en el cual se eliminan secuencias intrónicas

T: Timina

TA: Temperatura ambiente

TAP: *Tandem affinity purification*

TBP: Proteína de unión a TATA-box

TEV: Virus del grabado del tabaco

TF: factor de transcripción

U: Uracilo

UFP: Unidades formadoras de placas

UTR: Región no traducida

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

vRNA: RNA genómico viral

vRNP: Ribonucleoproteína genómica del virus de la gripe

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

WB: *Western Blot*

WSN: Virus de la gripe de la cepa A/WSN/33 (H1N1)

ZBP: Proteína de unión a secuencias zipcode

μg: Microgramo

μl: Microlitro

μM: Micro Molar

Introducción

1- EL CICLO DE VIDA DEL RNA MENSAJERO

La expresión de proteínas en la célula es un proceso altamente regulado. Cada eslabón, desde la modificación de la estructura de la cromatina hasta la traducción del RNA mensajero (mRNA) y su degradación, cuenta con múltiples pasos de regulación donde participan una gran variedad de proteínas y diferentes RNAs, tanto en el núcleo como en el citoplasma. La práctica totalidad de estos procesos conciernen al mRNA. Durante su ciclo de vida, el mRNA sufre procesos de maduración que incluyen diversas modificaciones a lo largo de su secuencia (tanto en las regiones no traducidas o UTR como en las regiones codificantes) y cambios en las proteínas que se le asocian. Estos procesos de maduración son clave en aspectos tan diversos como la traducción de diferentes isoformas de una misma proteína, la localización intracelular, la integridad del mRNA o su represión traduccional. Conocer cómo se lleva a cabo esta regulación desde la síntesis hasta la degradación de los mRNAs ha sido uno de los objetivos fundamentales de la biología molecular en estos últimos años para así poder entender en profundidad multitud de procesos celulares y patologías que hasta ahora no ha sido posible caracterizar.

1.1-Regulación del mRNA en el núcleo

1.1.1 Transcripción

El nacimiento del mRNA se produce con la formación del complejo de inicio de la transcripción sobre el gen que lo codifica. Este complejo está formado por las diferentes subunidades de la RNA polimerasa II (RNAPII), factores de transcripción (TF) como la proteína de unión a la TATA-box (TBP) o los factores TFIIB, TFIIE, TFIIIF y TFIIH (Orphanides et al, 1996; Reines et al, 1996). Una vez que la RNAPII está posicionada, la fosforilación de su CTD provocará un cambio en los componentes del complejo para proceder a la elongación del transcrito (Goodrich & Tjian, 1994; Kim et al, 2000).

1.1.2 Capping

Cuando el pre-mRNA alcanza una longitud de entre 22 y 25 nucleótidos se añade al extremo 5' la estructura CAP, formada por la 7-metil-guanosina y el primer nucleótido del mRNA unidos por un puente trifosfato 5'-5' (m^7GpppN). A esta estructura se une el complejo nuclear de unión a CAP (nCBC), formado por dos proteínas: la CBP20 y la CBP80 (Izaurralde et al, 1994), cuya unión protege al pre-mRNA de la acción de las 5'-3' exonucleasas (Furuichi, 1977), y es importante en los procesos de *splicing* (Inoue et al, 1989; Izaurralde et al, 1994),

poliadenilación (Cooke & Alwine, 1996) y transporte al citoplasma (Hamm & Mattaj, 1990; Izaurralde & Mattaj, 1992).

1.1.3 Splicing

El pre-mRNA contiene regiones no codificantes (5'UTR, 3'UTR e intrones) y regiones codificantes (exones). El proceso de *splicing* permite la delección de los intrones del pre-mRNA y la delección selectiva de exones. Este proceso puede dar lugar a la expresión de diferentes isoformas de una proteína codificadas en un mismo gen que pueden tener diferentes tamaños e incluso funciones. El complejo que realiza el *splicing* se denomina *spliceosoma*. Es un agregado macro-molecular formado por varias familias de proteínas entre las cuales destacan las proteínas de las snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein particles*), proteínas enriquecidas en serinas, argininas y prolinas como SR o SFPO, helicasas *Dead-box* dependientes de ATP como prp8 o prp22, proteínas de la familia hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles*) como hnRNPM o hnRNPF y snRNAs (*small nuclear RNAs*) como U1 y U6 (Chen & Cheng, ; Jankowsky, 2011; Raker et al, 1996). El *splicing* también tiene un efecto en los niveles de expresión de la proteína codificada en el mRNA. El complejo EJC (*Exon junction complex*) se une 20-22 nucleótidos por delante de las uniones entre exones del mRNA maduro (Le Hir et al, 2000) y posee diversas funciones, entre las cuales destacan el reconocimiento de codones *STOP* prematuros (Ma et al, 2008), el reconocimiento de la maquinaria de exportación del mRNA al citoplasma y el aumento de la eficiencia de la maquinaria de traducción (Le Hir & Seraphin, 2008).

1.1.4 Poliadenilación

Las modificaciones post-transcripcionales del pre-mRNA en el núcleo terminan con su modificación en el extremo 3'. En un primer paso, el pre-mRNA pierde su extremo 3' gracias a la acción de endonucleasas. Este proceso se realiza por la unión de los factores CPSF a la secuencia AAUAAA (ARE) (Jenny et al, 1994) y del complejo CtsF a una región rica en G/U (Takada et al, 1989). La PAP (*polyadenylate polymerase*) junto a los factores CF-I y CFII estabiliza el complejo, permite el corte del extremo 3' mediado por los factores CPSF y es la encargada de la adición de la cola de poliA. La proteína nuclear de unión a poliA (PABPN) la protege de las enzimas de deadenilación, regula el tamaño de la cola, participa en el transporte del mRNA al citoplasma y es clave en el inicio de la traducción (Bienroth et al, 1993; Sachs & Deardorff, 1992). Los únicos mRNAs celulares descritos hasta ahora que no poseen una cola de poliA son los mensajeros que codifican las histonas del DNA (Gilmartin, 2005).

1.1.5 mRNA Editing

Otro de los procesos que contribuye a la diversidad del transcriptoma celular es la edición del mRNA. Este fenómeno ocurre principalmente en RNAs con estructura secundaria en los cuales las enzimas adenosin deaminasas sustituyen adenosinas por inosinas en la secuencia del mRNA provocando un efecto en su estructura, estabilidad, localización, traducción y *splicing* (Pullirsch & Jantsch, 2010). Se ha descrito que la edición de mRNA afecta al procesamiento de miRNAs por las enzimas Dicer y Drosha y que puede afectar a la hibridación mRNA-miRNA (Habig et al, 2007; Kawahara & Nishikura, 2009; Kawahara et al, 2007). Es poco frecuente que este proceso ocurra en la región codificante del gen, sin embargo se ha descrito que este mecanismo puede provocar cambios puntuales de aminoácido en la proteína o incluso el *splicing* alternativo del mRNA por introducir, por ejemplo un codón stop prematuro (Levanon et al, 2005; Li et al, 2009; Ohlson et al, 2007).

1.1.6 Transporte de las mRNPs.

Cada paso en la formación del mRNA requiere de un riguroso control de calidad para detectar posibles errores durante la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA. Tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, muchas proteínas importantes para el procesamiento post-transcripcional del mRNA participan también en el transporte al citoplasma. El mRNA maduro junto a estos complejos proteicos forma ribonucleoproteínas que mediante su unión al complejo proteico TREX y a otras proteínas adaptadoras como ALY, p15 o Mtr2 interacciona con el poro nuclear para ser transportadas al citoplasma (Katahira & Yoneda, 2009; Masuda et al, 2005).

1.2 Regulación del mRNA en el citoplasma

En el citoplasma, las proteínas que acompañan al mRNA cambian. Así, a la estructura CAP, hasta ahora protegida por el complejo nCBC, se une el complejo formado por las proteínas eIF4E y eIF4G, esenciales para el inicio de la traducción. La proteína PABPN, que hasta ahora protegía la cola de poli-A, es desplazada por la proteína de unión a poliA citoplasmática PABPC. Este cambio en las proteínas de unión provoca una recircularización del mRNA por la interacción de eIF4E y eIF4G con la PABPC. La estructura circular forma el nicho necesario para iniciar la traducción del transcrito y lo protege de las exonucleasas citoplasmáticas.

1.2.1 Traducción del mRNA

La traducción de proteínas es un proceso por el cual la información genética contenida en los tripletes de ribonucleótidos de mRNA se decodifica en una secuencia de aminoácidos para dar lugar a las proteínas. Se divide clásicamente en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. La iniciación es el proceso más regulado (Pain, 1996) y requiere de la participación de una serie de factores proteicos conocidos como factores de iniciación de la traducción (eIFs) tales como eIF4E, eIF4G, eIF4A o eIF3 entre otros, que actúan de puente entre el mRNA y la subunidad menor del ribosoma, facilitando el reconocimiento del codón de iniciación y su ensamblaje con la subunidad mayor para formar el ribosoma completo y permitir la elongación. Los factores de terminación (eRFs) unidos a un codón *stop* inducirán el desensamblaje de la maquinaria y el fin de traducción (Jackson et al, 2012).

1.2.2 Represión y degradación del mRNA

Si bien la función primordial del mRNA es ser traducido a proteína, en el citoplasma aparecen múltiples mecanismos reguladores para determinar cómo, cuándo y dónde se realiza este proceso. Así, se han descrito tanto multi-complejos proteicos (elementos en *trans*) como señales dentro de la secuencia (elementos en *cis*) del mRNA que determinan cuándo y dónde puede traducirse o degradarse.

1.2.2.1 El complejo RISC

El complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC del inglés *RNA-induced silencing complex*) participa en la degradación y/o represión de mRNAs mediada por RNAs de pequeño tamaño (miRNAs, piRNAs, iRNAs, etc). Estos RNAs, una vez unidos al complejo RISC, hibridan de forma parcial o completamente complementaria con un mRNA diana y regulan su traducción (Kawamata & Tomari, 2010

). El núcleo del complejo está formado por las proteínas de la familia Argonauta, formada a su vez por dos grupos; la subfamilia PIWI y la subfamilia mejor estudiada AGO (Bohmert et al, 1998; Carmell et al, 2002; Cox et al, 1998). Esta familia consta de 4 proteínas, llamadas Ago1 a Ago4 que forman complejos muy similares (Landthaler et al, 2008) capaces de unir miRNAs y reprimir y/o degradar el mRNA diana, aunque la única proteína de la familia con la actividad endonucleasa es Ago2 (Meister et al, 2004). En el análisis proteómico de los complejos formados por las proteínas AGO se identificaron proteínas relacionadas con el procesamiento de miRNAs como Dicer, helicasas de RNA como DDX5 o DDX17 y proteínas como MOV10 o TNR6B (llamada GW182 en *D. melanogaster*). GW182 se ha postulado como una proteína

clave durante el silenciamiento génico en *D. melanogaster*, donde la disminución de sus niveles de expresión provoca una supresión del silenciamiento de mRNAs mediado por miRNAs (Rehwinkel et al, 2005) de forma independiente de Ago2 (Behm-Ansmant et al, 2006a; Behm-Ansmant et al, 2006b) y de su localización en P-Bodies (Eulalio et al, 2009). Estos datos sugieren que la proteína tiene una función en la etapa efectora del silenciamiento. En humanos existen 3 proteínas parálogas a GW182: TNR6A, TNR6B y TNR6C que se localizan en gránulos de represión de la traducción y degradación como son los P-Bodies (Liu et al, 2005; Sen & Blau, 2005), en gránulos de transporte y de localización de la traducción como los gránulos neuronales (Barbee et al, 2006) y en gránulos de estrés (Leung et al, 2006).

1.2.2.2 miRNAs: Biogénesis y función

Los miRNAs son RNAs de pequeño tamaño (20-25nt) no codificantes y conservados entre especies que regulan la traducción de mRNAs. Están codificados a lo largo del genoma, de manera aislada o en tándem bajo un mismo promotor (Kim et al, 2004; Krichevsky et al, 2003; Pedersen et al, 2007). La mayor parte de los miRNAs se transcriben bajo la acción de la RNA polimerasa II (Lee et al, 2004) dando lugar a un pri-miRNA de tamaño variable con estructura CAP y una cola de poliA en el extremo 3' terminal (Cai et al, 2004). Este precursor es procesado por la endonucleasa Drosha en el núcleo (Lee et al, 2003), dando lugar a un pre-miRNA de tamaño definido de entre 65 y 100 nucleótidos. La exportina 5 junto con varias proteínas de la familia de las importinas- β transloca el pre-miRNA al citoplasma, aunque hay estudios que sugieren que Ago2 podría tener un papel en el transporte y procesamiento de los miRNAs en el núcleo (Tan et al, 2009; Weinmann et al, 2009). Una vez en el citoplasma, la proteína Dicer junto a los cofactores PACT y TRBP, lo procesa a una molécula de RNA de doble cadena de un tamaño de entre 20 y 25 nucleótidos, (Hutvagner et al, 2001; Ketting et al, 2001). Las proteínas de la familia Argonauta son las encargadas de separar las dos cadenas de RNA y mediar la hibridación del complejo RISC con su mRNA diana (**Figura 11**).

En mamíferos, se ha sugerido que los miRNAs podrían regular la expresión de alrededor del 50% de los genes celulares. En humanos, se expresan unos 800 miRNAs individuales. En los últimos años se han publicado multitud de estudios en los que se describe la participación de los miRNAs en procesos tan diversos como respuesta inmunológica (Li et al, 2013), proliferación celular y cáncer (Farazi et al, ; Hatfield et al, 2005; Lages et al), desarrollo del sistema nervioso y diferenciación neuronal (Coolen & Bally-Cuif, 2009; Fiore et al). Dos de los miRNAs más estudiados en este último apartado son miR-9 y miR-124. Se expresan preferentemente en células neuronales y aumentan su expresión durante la diferenciación de

los precursores neuronales a neuronas (Krichevsky et al, 2006). Ambos miRNAs regulan la expresión de proteínas del complejo REST (Conaco et al, 2006; Packer et al, 2008) que inhibe la expresión de genes neuronales en precursores neuronales. Además se ha descrito que la expresión de estos dos miRNAs en células en cultivo provoca un cambio morfológico en las células adoptando características neuronales (Yoo et al, 2009) y que su expresión en células de fibroblasto humano induce su conversión a neuronas (Yoo et al, 2011). Por otro lado miR-124 regula la expresión de PTBP1 y SOX9, un modulador de *splicing* y un factor de transcripción respectivamente que son importantes para el desarrollo y la diferenciación neuronal (Cheng et al, 2009b; Makeyev et al, 2007).

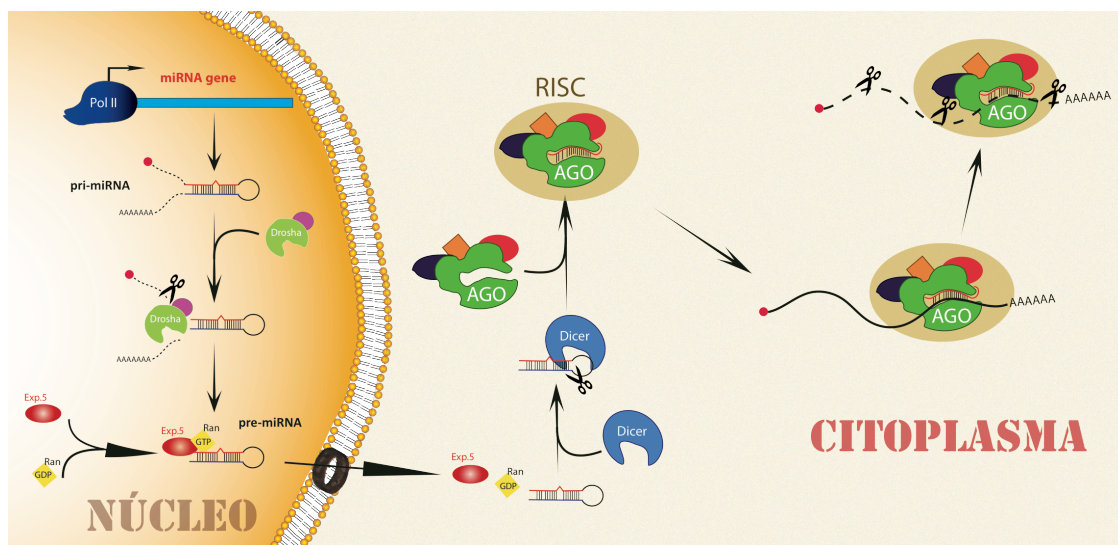


Figura I1: Procesamiento y ensamblaje de los miRNAs a la maquinaria RISC desde su transcripción hasta su hibridación con el mRNA diana. La RNA polimerasa II transcribe un pri-miRNA. Tras su procesamiento por Drosha, forma un nuevo precursor llamado pre-miRNA que se transloca del núcleo al citoplasma a través de la exportina 5. Una vez allí Dicer lo procesa dando lugar a un miRNA de doble banda el cual se incorpora en forma de RNA de cadena sencilla al complejo RISC. Este complejo media la unión del miRNA con su mRNA diana para reprimir su traducción o degradarlo.

1.3 Decapping y deadenilación

Tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, la estructura CAP y la cola de poliA son los elementos más determinantes en la estabilidad del mRNA. En general la ausencia de estas estructuras, su modificación o la pérdida de las proteínas asociadas a éstas provoca la acción de las enzimas de *decapping* y deadenilación y la consecuente degradación del mRNA.

La deadenilación se lleva a cabo en dos fases (Chen & Shyu). En la primera de ellas, las proteínas PAN2 y PAN3 acortan la cola de poliA hasta un tamaño de aproximadamente 100

nucleótidos. Acto seguido, se procede a un segundo acortamiento de la cola hasta unos pocos nucleótidos a través del complejo CCR4-NOT si es independiente de CAP (Chen & Shyu), o por PARN si es dependiente de CAP (Martinez et al, 2001). Recientemente se ha descrito que el proceso de deadenilación puede ser reversible durante el desarrollo de células germinales, embriogénesis y en zonas post-sinápticas de células neuronales (Colegrove-Otero et al, 2005; Kimble & Crittenden, 2005; Radford et al, 2008).

El *decapping* es el proceso por el cual se libera la estructura CAP del extremo 5' del mRNA. La enzima efectora de este proceso es DCP2, (Piccirillo et al, 2003; van Dijk et al, 2002) que corta preferentemente mRNAs con estructura CAP con una longitud superior a 25nt, siendo incapaz de hidrolizar el CAP libre. Además, se han descrito varias proteínas activadoras de la acción de DCP2 como DCP1p en *S. cerevisiae* (Steiger et al, 2003) (de la cual existen dos proteínas homólogas en humanos: hDCP1a y hDCP1b (Lykke-Andersen, 2002) RCK/p54 y Pat1 (Coller & Parker, 2005). Existen diversas proteínas que inhiben el *decapping* de los mRNAs como eIF4E, que limita el acceso de DCP2 al extremo 5' e impide su acción en la estructura CAP tanto *in vitro* (Schwartz & Parker, 1999; Schwartz & Parker, 2000) como *in vivo* (Grudzien et al, 2006). En el extremo 3' del mRNA, la proteína de unión a poliA, PABPC es capaz de inhibir el *decapping* del mRNA en levaduras (Wilusz et al, 2001) y en mamíferos, al menos *in vitro* (Bernstein et al, 1989).

1.4 Degradación mediada por exonucleasas 5'→3' o, 3'→5'

La pérdida de la estructura circular del mRNA por la deadenilación o el decapping, provoca la accesibilidad de enzimas con actividad exonucleasa al mRNA, tanto en dirección 5'→3' como en dirección 3'→5'. La exonucleasa responsable de la degradación 5'→3' es XNR1, que degrada por un lado mRNAs monofosforilados y además los extremos 5' de mRNAs previamente digeridos por la acción de endonucleasas en procesos como el NMD o la degradación de mRNAs mediada por miRNA (Hutvagner et al, 2001; Orban & Izaurralde, 2005). La degradación 3'→5' se lleva a cabo gracias a la acción del exosoma, un multicomplejo formado por 3 heterodímeros (Rps41-Rps45, Rps46-Rps43 y Mtr3-Rps43) (Hernandez et al, 2006; Liu et al, 2006) y por la proteína Rps44 (Dziembowski et al, 2007), la unidad catalítica del complejo. Además, el exosoma es reclutado por la maquinaria de degradación mediada por endonucleasas gracias a su interacción con el complejo SKY (Anderson & Parker, 1998; Araki et al, 2001)) para una vez hidrolizado el mRNA proceder a su degradación 3'→5'.

1.5 Degradación mediada por endonucleasas

Además, existen otros mecanismos de degradación del RNA que sirven como controles de calidad, eliminando mRNAs que contienen errores como la aparición de codones stop prematuros o la desaparición del stop codon.

1.5.1. *Non-stop (NSD) y Non-go mediated decay (NGD)*

La vía de degradación NSD se activa cuando un mRNA celular no posee en su secuencia un codón de terminación, ya sea por mutaciones en su secuencia o por una poliadenilación prematura del transcrito. El modelo descrito propone que la llegada del ribosoma a la cola de poliA provoca un desplazamiento de la proteína PABP y un atasco del complejo de traducción que lleva al reclutamiento del complejo SKY y la posterior degradación del mRNA por la acción del exosoma (van Hoof & Parker, 2002). La vía de degradación NGD está muy poco caracterizada y sólo se ha descrito en levaduras. El atasco del ribosoma producido por la estructura secundaria del mRNA reclutaría al complejo NGD e impediría la unión de factores de traducción al mRNA provocando la hidrólisis del mRNA y su consiguiente degradación (Doma & Parker, 2006).

1.5.2 *Non-sense mediated decay (NMD)*

El NMD es un mecanismo por el cual se eliminan los nuevos mRNAs que poseen en su secuencia un codón de terminación prematuro (Garneau et al, 2007). El núcleo del complejo está formado por las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3, conservadas entre las diferentes especies (Conti & Izaurralde, 2005). Cuando la maquinaria traduccional avanza a lo largo del mRNA, va liberando los complejos EJC que se encuentran unidos a éste como consecuencia del *splicing* en el núcleo. Al pararse la maquinaria en un codón de terminación, UPF1 se une al complejo junto a SMG1 (Hwang et al). Si sobre el mRNA aún aparecen unidos complejos EJC *por detrás* del codon stop, UPF1 media la unión con éstos y se fosforila. Esta nueva estructura provoca por un lado el *decapping* del mRNA y por otro el reclutamiento de las proteínas SMG7 y SMG6, que hidroliza el mRNA y permite el acceso del exosoma, y de XNR1 para su degradación.

1.5.3. *Staufen mediated decay (SMD)*

El SMD es un proceso alternativo de degradación de mRNAs que no contienen errores en su secuencia, y que parece regular los niveles de expresión de los mRNAs diana. En este sistema, participan UPF1 y hStaufen1 (Kim et al, 2005). Esta última proteína se une a un sitio específico

en la región 3' UTR de ciertos mensajeros (*Staufen-binding site*, SBS), de forma independiente de secuencia pero dependiente de su estructura secundaria. La capacidad de Staufen de interaccionar con UPF1 provoca el reclutamiento de ésta, su fosforilación y la degradación del mRNA. Datos publicados sugieren que la vía del SMD podría tener un papel importante en la diferenciación celular de mioblastos. El estudio muestra como durante este proceso, UPF2, factor que participa en el NMD pero no en el SMD, disminuye su expresión de manera acusada (Gong et al, 2009). De este modo la eficiencia del SMD aumenta mientras que disminuye en el caso del NMD sugiriendo que el balance entre la eficiencia del SMD y el NMD sería importante para la diferenciación de este tipo celular.

1.6 Gránulos de represión, degradación y transporte de RNA

Tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, en la degradación y la represión de los mRNAs participan multitud de complejos proteicos que también contienen RNAs de pequeño tamaño. Un mRNA reprimido o en proceso de degradación es capaz de acumularse intracelularmente en zonas específicas, transportarse a lo largo de la célula hasta el lugar dónde será traducido o localizarse hasta recibir un estímulo externo y sólo entonces traducirse. Esto es posible gracias a que el mRNA, junto a muchas de las proteínas de los complejos descritos en los apartados anteriores (proteínas de unión a CAP y poliA, proteínas de la traducción y su regulación, degradación etc.), se incorporan a su vez a diferentes estructuras intracelulares para llevar a cabo su función (**Figura I2**).

1.6.1 Gránulos de células germinales

Los gránulos de células germinales (GCG) son complejos ribonucleoproteicos que contienen mRNAs de origen materno traduccionalmente reprimidos que son necesarios para el desarrollo de líneas células germinales y del embrión. La acumulación o ausencia de los GCG en diferentes polos celulares determina una asimetría en la división celular y una diferenciación de cada célula resultante. Como ejemplo, durante la formación del eje antero-posterior del embrión de *D. melanogaster* es necesaria la polarización de los mRNAs *oskar* y *bicoid* en el polo posterior y anterior respectivamente en las fases tempranas del desarrollo. En este proceso participan proteínas como DCP1, Staufen1 y proteínas del complejo EJC (Newmark & Boswell, 1994; St Johnston et al, 1991; van Eeden et al, 2001).

1.6.2 Gránulos de estrés

En condiciones de estrés como cambios bruscos de temperatura, estrés oxidativo, radiación ultravioleta, hipoxia u otras, las células generan estructuras ribonucleoprotéicas llamadas

gránulos de estrés (SG) que funcionan como centros de clasificación de mRNAs donde reprimirlos hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables para reiniciar su traducción o promover su degradación (**Figura I2**) (Doyle & Kiebler, 2011). El núcleo de estos gránulos está formado por el complejo de iniciación de la traducción, el cual incluye la subunidad pequeña del ribosoma (40S) y los factores del inicio de la traducción eIF2, eIF3, eIF4E y eIF4G (Kedersha & Anderson, 2002; Kimball et al, 2003). Además, los SG contienen las proteínas PABP1, RCK/p54, XRN1, TIA-1 y varias proteínas de unión a RNA de doble banda como Staufen, FMRP, TTP, G3BP o SMG (Kedersha et al, 1999; Stoecklin et al, 2004; Thomas et al, 2005; Tourriere et al, 2003; Wilczynska et al, 2005).

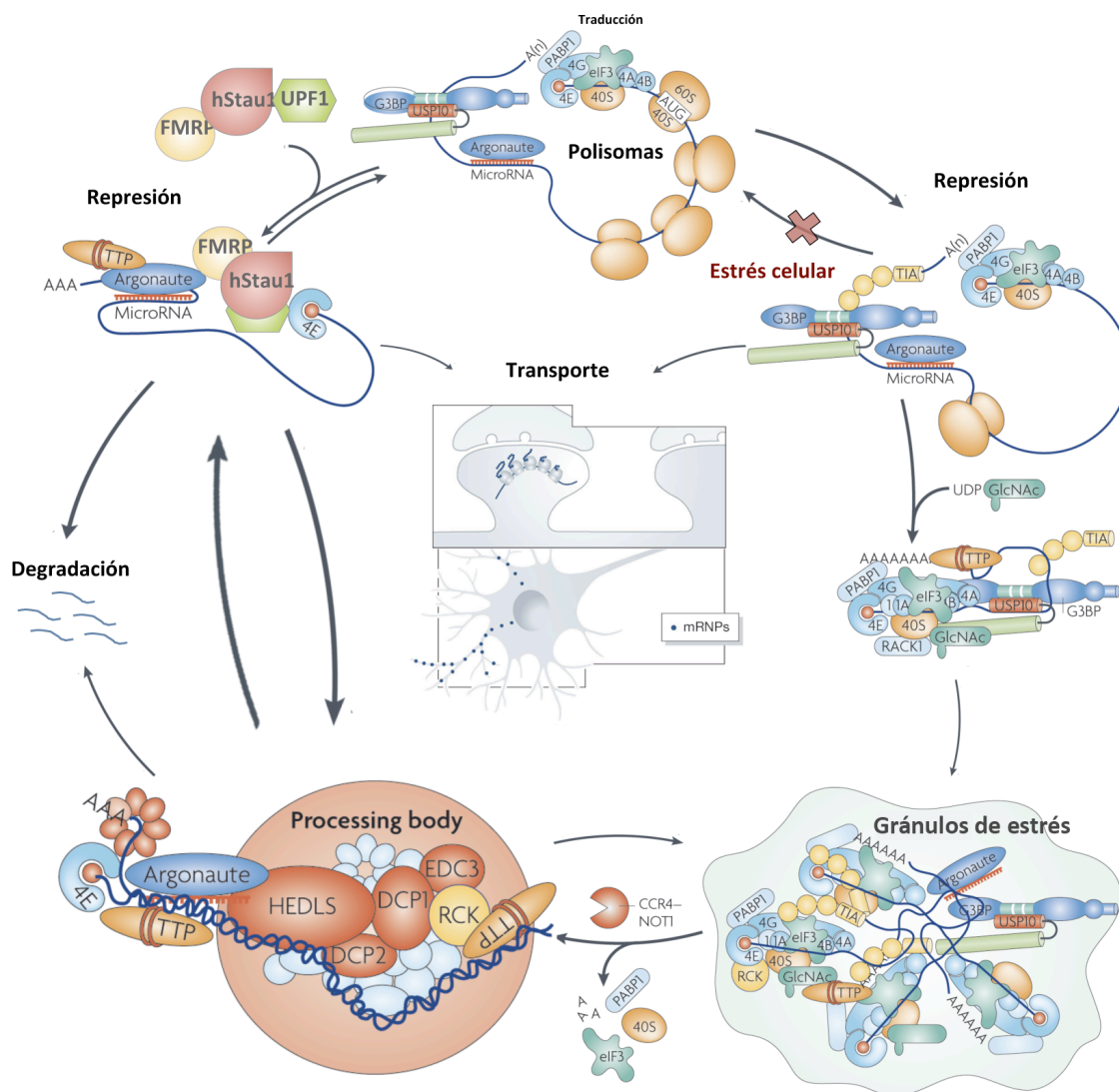


Figura I2: Esquema de la relación dinámica entre los diferentes gránulos de represión y degradación de mRNAs presentes en la célula. La represión de la traducción puede producirse por diferentes vías, ya sea por condiciones de estrés, deadenilación del mRNA, proceso NMD, SMD, silenciamiento génico etc. (Adaptado de Doyle&Kiebler 2011 y Anderson&Kedersha 2009). El mRNA linealizado (vía de la izquierda) puede ser degradado, transportado o acumulado en P-bodies. El mRNA circularizado puede ser transportado o acumulado en los gránulos de estrés. Los mRNAs generan un flujo dinámico entre los distintos gránulos celulares.

1.6.3 Processing Bodies

Los PB son gránulos de represión y degradación de RNA que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas. Son muy dinámicos (Brenneman et al, 2005; Kedersha et al, 2005) y, a diferencia de los SG, su ensamblaje no depende de las condiciones de estrés a las que está sometida la célula sino que existen en el citoplasma de manera permanente salvo en el proceso de mitosis. Comparten componentes con los SG como las proteínas relacionadas con la degradación de mRNAs RCK/p54, XRN1 o TTP, proteínas de unión a RNA de doble banda como Staufen o FMRP, componentes del complejo RISC como Ago2 y elementos del complejo NMD como UPF1 (Barbee et al, 2006) (**Figura 12**) aunque no se ha detectado la subunidad pequeña del ribosoma ni la proteína G3BP (Kedersha et al, 2005). Sin embargo se ha descrito la presencia de la proteína GW182 (Rehwinkel et al, 2005).

1.6.4 Gránulos de transporte

El transporte intracelular de los mRNAs como mecanismo para la traducción localizada de proteínas está implicado en numerosos procesos tales como la división celular asimétrica (Broadus et al, 1998a), la determinación de los ejes de simetría embrionarios (St Johnston et al, 1991), la movilidad celular (Kislauskis et al, 1993; Kislauskis et al, 1994), la polarización neuronal (Bassell et al, 1999) o la plasticidad sináptica (Laggerbauer et al, 2001).

Las células neuronales son uno de los modelos más utilizados para este tipo de estudios por la alta polarización de sus estructuras (axón, soma, dendritas). Aunque muchos de los mRNAs celulares se localizan en el soma de la neurona, existe una fracción que se transporta hacia las dendritas y el axón (Cajigas et al, 2012; Hirokawa, 2006). Elvira y cols analizaron los gránulos de RNA en células embrionarias de cerebro de rata y observaron que contenían el mRNA que codifica la β -actina, proteínas ribosomales, proteínas de unión a RNA como Staufen1, ZBP1 o FMRP, proteínas de unión a microtúbulos y *DEAD-box* helicasas entre otras (Elvira et al, 2006).

Los últimos estudios realizados en este campo han caracterizado la importancia de las proteínas de unión a RNA en la localización de mRNAs en la célula. Por ejemplo, ZBP1 facilita el transporte del mRNA de β -actina inhibiendo su traducción hasta que alcanza la periferia de la célula (Huttelmaier et al, 2005; Zhang et al, 2001) y contribuye a la correcta formación de ramificaciones en dendritas durante el desarrollo (Pesiridis et al, 2011) viajando hasta las espinas dendríticas bajo estimulación sináptica. La proteína causante del síndrome del X frágil (FMRP) es responsable de la regulación de ciertos mRNAs y de su tráfico en dendritas (Zalfa et al, 2006). FMRP se asocia a gránulos de RNA que se desplazan a las dendritas una vez se

produce la activación de los receptores neuronales de glutamato (Antar et al, 2004), regula la traducción de mRNAs tanto *in vivo* como *in vitro* y se asocia a complejos ribonucleoproteicos y a polisomas, en este último caso en la base y/o en el interior de las espinas dendríticas (Ashley et al, 1993; Feng et al, 1997; Lagerbauer et al, 2001; Li et al, 2001). Además, se asocia a proteínas del complejo RISC, al RNA no codificante de pequeño tamaño BC1 (Barbee et al, 2006; Zalfa et al, 2003) y a miRNAs. Mutaciones en el gen provocan el síndrome X frágil, una de las causas más comunes de retraso mental (Warren & Nelson, 1994) Todos estos estudios sugieren que FMRP participa en el correcto desarrollo del sistema nervioso, así como en la plasticidad sináptica, aunque los mecanismos de acción podrían ser muy dispares.

Otra de las proteínas de unión a RNA de doble banda presente en los gránulos de transporte es Staufen1 sobre la que desarrollará en los siguiente apartados por ser objeto de estudio en esta Tesis.

2 LA PROTEÍNA hSTAUFEN1

2.1 Antecedentes

La proteína dmStaufen pertenece a la familia de proteínas de unión a RNAs de doble cadena (dsRNA). Contiene 5 dominios de unión a dsRNA (RBDs) de entre 65 y 68 aminoácidos, siendo el RBD3 el que más fuertemente une RNA (St Johnston et al, 1992). Es un factor materno que participa en la localización de mRNAs y está implicado en la diferenciación antero-posterior del embrión temprano de *D. melanogaster*, participando en la localización de los mRNAs *bicoid* y *oskar* (St Johnston et al, 1991). Además se ha descrito su implicación en la correcta localización del mRNA *prospero*, un mRNA necesario en el establecimiento de asimetrías de división de los neuroblastos para un desarrollo correcto del sistema nervioso central (Broadus et al, 1998b; Shen et al, 1998) y su asociación con gránulos neuronales relacionados con los P-Bodies en *D. melanogaster* (Barbee et al, 2006).

En 1999 se identificó una proteína homóloga en humanos, hStaufen1 a partir de una genoteca de cDNA humano mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando como cebo la proteína NS1 del virus de la gripe de tipo A. La proteína humana carece del extremo amino terminal de la proteína de mosca, conserva 4 de los 5 dominios de unión a dsRNA, e incluye un nuevo dominio de unión a microtúbulos. Existen 4 isoformas de hStaufen1 generadas por *splicing* alternativo que corresponden a dos tamaños: Stau1⁶³, Stau1⁵⁵. Todas las isoformas tienen una localización perinuclear, bien sea en el retículo endoplasmático rugoso o asociado a polisomas (Marión et al, 1999; Wickham et al, 1999). Además, se ha observado la

colocalización de la proteína homóloga mStaufen1 con gránulos proteicos que contienen mRNAs en somatodendritas de neuronas de hipocampo de rata (Kiebler et al, 1999; Kohrmann et al, 1999).

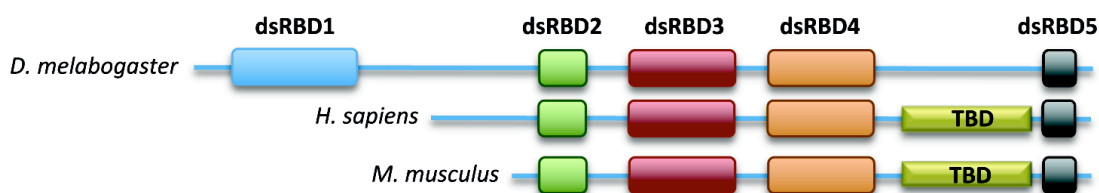


Figura I3: Estructura de la proteína Staufen1 en *D. melanogaster* y en mamífero. La proteína dmStaufen1 contiene cinco dsRBDs mientras que los homólogos de mamífero carecen del extremo amino terminal de la proteína. La proteína de mamífero además contiene un dominio de unión a tubulina.

2.2 Staufen1 y los gránulos de RNA

En las somatodendritas de neuronas de hipocampo de rata, los gránulos de RNA que contienen mStaufen1 poseen un movimiento bidireccional a través de haces de microtúbulos (Kohrmann et al, 1999). Se identificaron diferentes tipos de complejos de Staufen1: gránulos de un tamaño mayor de 2MDa, partículas de alrededor de 650 kDa y dímeros y monómeros de la proteína (Mallardo et al, 2003) . Los gránulos de mayor tamaño comigraban con proteínas del retículo endoplasmático y con marcadores ribosomales, en cambio las partículas de 650 kDa comigraban con la cadena pesada de la kinesina, con la β -tubulina y además con los RNAs localizados BC1 y CaMKII α . Estos datos sugieren que mientras que los gránulos de Staufen son estructuras estáticas, las partículas de menor tamaño participan en el transporte de mRNAs mediado por microtúbulos.

En *D. melanogaster*, Staufen1 forma gránulos en células neuronales que contienen proteínas de los PB como Ago2, la helicasa Me31B (RCK/p54 en mamíferos), las exonucleasas DCP1 y Pacman (Xrn1 en mamíferos) o la proteína del NMD Upf1 (Barbee et al, 2006). El mismo estudio muestra que hay una relación entre los complejos de Staufen1 y los PB en mosca y que Me31B es importante para la arborización dendrítica. Ya que Staufen y FMRP interaccionan con Me31B y con proteínas del complejo RISC, se sugirió que Staufen1 podría tener del mismo modo un papel durante la diferenciación neuronal junto a la maquinaria de silenciamiento por miRNAs.

La proteína humana hStaufen1 forma complejos de entre 6 y 10 MDa y varios estudios han mostrado su unión a RNAs celulares, tanto mRNAs como RNAs ribosómicos (Furic et al, 2008;

Kim et al, 2005; Villacé et al, 2004). Mediante ensayos de marcaje radiactivo con γ -P³²-ATP se determinó que los complejos de hStaufen1 son capaces de unir RNAs de tamaños muy heterogéneos, entre ellos RNAs de pequeño tamaño que corresponden con el tamaño descrito para pre-miRNAs (65-70nt) y miRNAs maduros (20-25nt) (Tesis P.Villacé). Los datos planteaban la posibilidad de que los miRNAs o sus precursores estuvieran asociados a los complejos de hStaufen1. En cuanto a las proteínas presentes en los complejos de hStaufen1, ensayos de espectrometría de masas e inmunológicos identificaron una asociación con proteínas del citoesqueleto como tubulina o β -actina, proteínas motoras como dineína o kinesina, proteínas relacionadas con la traducción de mRNAs como las proteínas ribosomales L6 y L28 y proteínas de represión y degradación de la traducción como UPF1 o FMRP (Kim et al, 2005; Villacé et al, 2004). Por último, se ha observado que hStaufen1 es reclutada hacia los gránulos de estrés en condiciones de estrés oxidativo, colocalizando con el marcador de SG TIAR y con G3BP (Thomas et al, 2005).

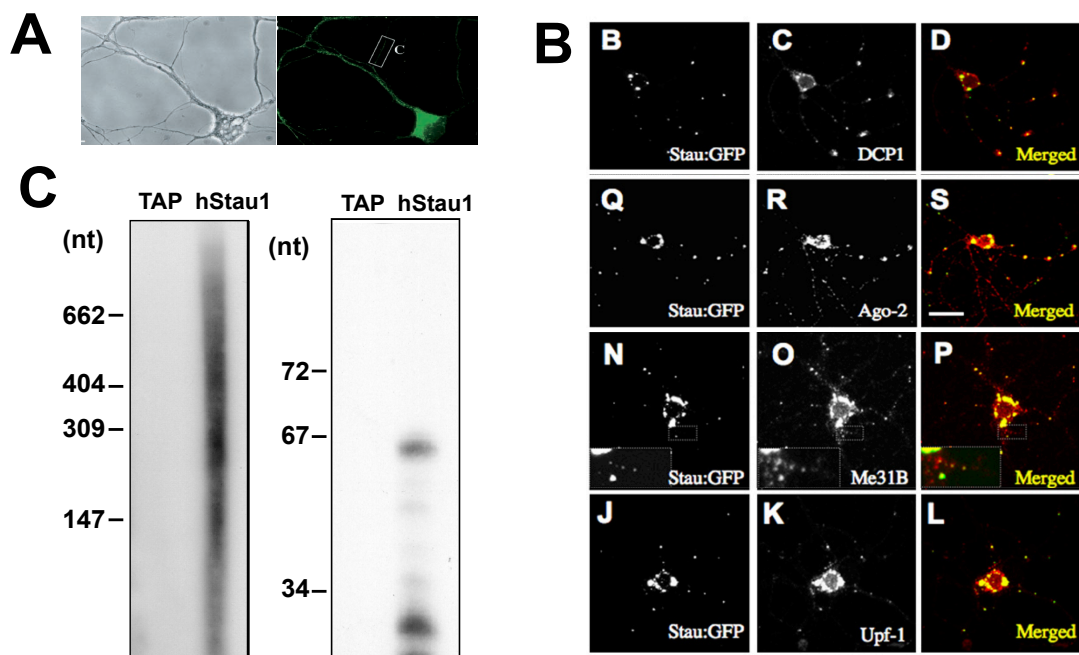


Figura 14: Composición de los gránulos de Staufen1. (A) La proteína Staufen1 forma complejos ribonucleoproteicos llamados gránulos de RNA en somatodendritas de hipocampo de rata (Adaptado de Kohrmann et al 1999). (B) dmStaufen1 interacciona con las proteínas Ago2, Me31B, UPF1 y Dcp1 en células de *D. melanogaster* (Adaptado de Barbee et al 2006). (C) hStaufen1 une RNAs de un tamaño heterogéneo (Villacé P, datos no publicados).

2.3 Staufen1 y su implicación en diferenciación neuronal y plasticidad sináptica

La diferenciación morfológica de las neuronas es el resultado de una secuencia de eventos que especifican la organización asimétrica y polarizada de los componentes y propiedades de la célula en base al desarrollo de 3 compartimentos neuronales: el soma o cuerpo celular, el axón y las dendritas. Estos eventos requieren, entre otros procesos, del transporte y traducción localizada de mRNAs celulares. Tal y como se ha desarrollado en apartados anteriores, hStaufen1 participa en el transporte de RNAs formando gránulos ribonucleoproteicos tanto en células de hipocampo de rata como en células de *D. melanogaster* (Barbee et al, 2006; Broadus et al, 1998b; Kohrmann et al, 1999; Shen et al, 1998). Por ello se han realizado en los últimos años estudios en los que se ha analizado la implicación de Staufen1 en la diferenciación neuronal y plasticidad sináptica.

En 2008 se generó un ratón mutante, *Stau1(tm1Apa)*, que contiene una delección en el tercer dominio de unión a RNA del gen de la proteína Staufen1, lo que provoca una pérdida de la función de la proteína por su incapacidad de unir RNA (Vessey et al, 2008). Si bien el ratón es viable, presenta una disminución del número de ramificaciones dendríticas en células neuronales a partir del orden dendrítico secundario, una disminución del número de gránulos que contienen el mRNA de β -actina en las partes más distales de la célula y una incorrecta maduración de las espinas dendríticas. Este último resultado confirma datos previos en los que se observó que el silenciamiento de Staufen1 en células piramidales de hipocampo provoca una disminución de la potenciación a largo plazo y cambios morfológicos en las espinas dendríticas y en su actividad sináptica (Lebeau et al, 2011; Lebeau et al, 2008). Además, el estudio mostró que el cambio morfológico de las espinas está mediado por el receptor de plasticidad sináptica NMDA.

2.4 Implicación de hStaufen1 en infecciones virales

2.4.1 hStaufen1 y el virus de la gripe

En la búsqueda de factores celulares asociados al virus de la gripe se identificó la interacción de hStaufen1 con la proteína NS1 del virus (Falcón et al, 1999; Marión et al, 1999). Además, hStaufen1 colocaliza a tiempos tempranos de la infección con NS1 y con las RNPs (de Lucas et al, 2010). Por otro lado, en los complejos de hStaufen1 se encuentran tanto mRNAs virales como vRNAs (ver **apartado 3**), lo que sugiere un papel dual de hStaufen1, en el transporte de los mRNAs virales, que se incorporan en los complejos como cualquier otro mRNA celular, y en el transporte de las RNPs progenie. Por último, el silenciamiento del gen de hStaufen1 en

células HEK293T no provoca ningún efecto en la acumulación de proteínas virales en la célula infectada aunque el título viral disminuye alrededor de 10 veces.

2.4.2 hStaufen1 y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*. Su genoma está compuesto por dos moléculas de RNA de cadena simple y polaridad positiva. Durante el ensamblaje del virus es necesaria la multimerización de la proteína Gag o pr55^{Gag} para la selección del genoma viral, su correcto empaquetamiento y la formación del virión. hStaufen1 interacciona con los complejos de la proteína pr55^{Gag} (Chatel-Chaix et al, 2004; Mouland et al, 2000) de forma dependiente del dominio RBD3. Además hStaufen1 se incorpora en el virión de VIH y tanto su sobreexpresión como su silenciamiento afecta al número de copias de genoma viral incorporado en los viriones lo que sugiere que podría tener un papel en el empaquetamiento del virus participando en el transporte del genoma a los sitios de encapsidación de los viriones (Mouland et al, 2000).

3- EL VIRUS DE LA GRIPE

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomixoviridae*. Los virus de esta familia se caracterizan por tener una membrana lipídica externa y por poseer un genoma segmentado de moléculas de RNA de polaridad negativa. Incluye varios géneros, entre ellos: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* y *Influenzavirus C*. A lo largo de esta Tesis se hará referencia exclusivamente al género *Influenzavirus A*, por ser el más relevante clínicamente y ser el principal modelo de estudio en el laboratorio.

3.1 La partícula viral

Los viriones son heterogéneos y pleomórficos, aunque tienden a adoptar formas esféricas o filamentosas según la cepa y la célula hospedadora (Horikami et al, 1992; Horne et al, 1960; Hoyle et al, 1961). Poseen una envuelta lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula infectada (Compans & Chopin, 1975) donde se encuentran expuestas las proteínas NA y HA, que son los principales determinantes antigénicos del virus. La proteína M2 también se encuentra en la envuelta del virión (Zebedee & Lamb, 1988) y forma canales iónicos que permiten el paso de protones desde los endosomas hasta el interior de la partícula viral facilitando el desensamblaje en las etapas iniciales de la infección (Holsinger & Lamb, 1991; Pinto et al, 1992). Bajo la envuelta lipídica se encuentra la matriz del virus compuesta por la proteína M1, la proteína más abundante y la más conservada evolutivamente (Nayak et al, 2004) La proteína NEP es la proteína estructural menos abundante y se la ha relacionado

funcionalmente con la exportación de las RNPs progenie del núcleo al citoplasma (Neumann et al, 2000; O'Neill et al, 1998).

En el interior de la matriz se encuentra el genoma segmentado del virus, formado por 8 ribonucleoproteínas (RNPs) (**Figura 15A**). Cada una de ellas está compuesta por un segmento de RNA genómico superenrollado (Hsu et al, 1987), recubierto por la nucleoproteína (NP) (Klumpp et al, 1997), al que se ancla el complejo de la polimerasa viral compuesto por las subunidades PB1, PB2 y PA. El trímero de la polimerasa es el encargado de llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada.

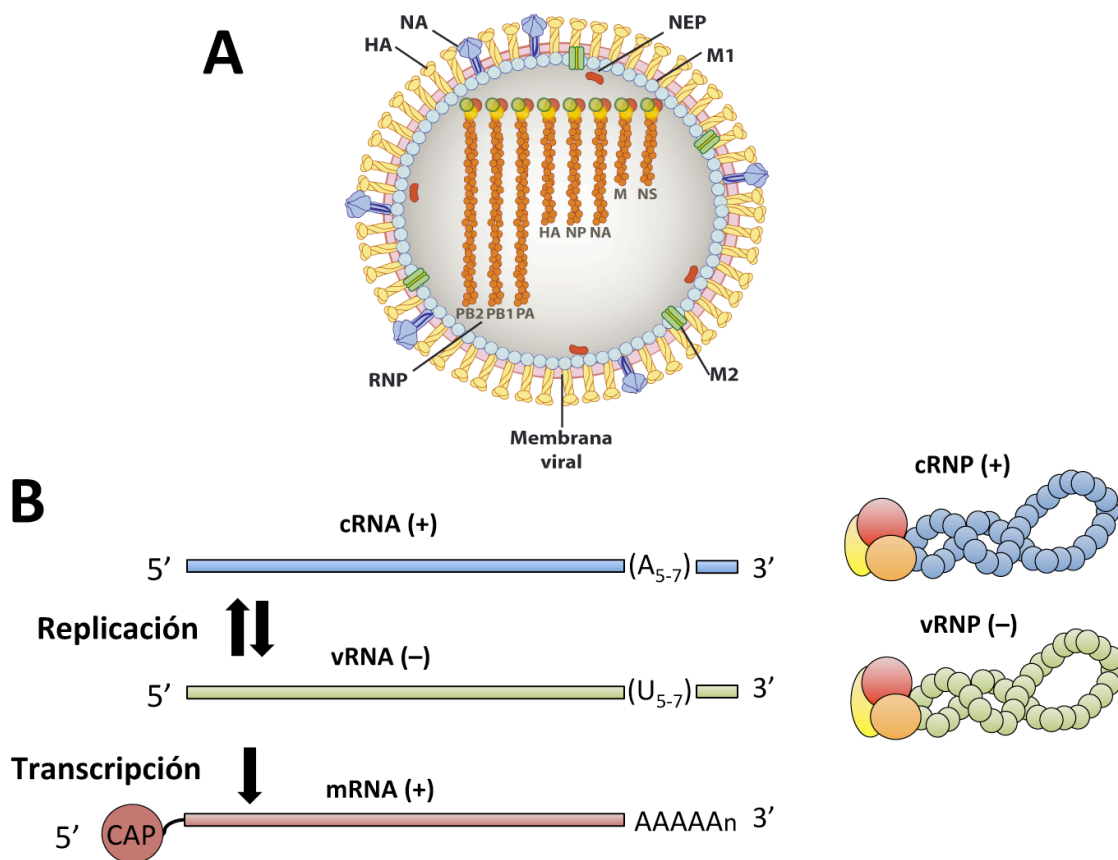


Figura 15: Representación esquemática de una partícula del virus de la gripe y sus RNAs. (A) El virión está compuesto por 9 de las proteínas que codifica su genoma. Se muestran las 2 glicoproteínas de membrana (HA y NA), el canal iónico (M2), la proteína matriz (M1), la proteína NEP, las ocho RNPs (compuesta por el RNA, NP y el trímero de la polimerasa PB1, PB2 y PA) y la membrana del virus (Adaptado de Jorba et al, 2009). (B) RNAs y RNPs virales presentes en la célula. El RNA genómico de polaridad negativa (vRNA) se transcribe generando los mRNAs virales. El mRNA viral contiene la estructura CAP que proviene de mRNAs celulares y un extremo poliA sintetizado por la polimerasa viral. Por un proceso de replicación se generan intermediarios replicativos (cRNAs, cRNPs) que son una copia exacta en polaridad positiva del vRNA y sirven de molde para dar lugar a la progenie viral (vRNA, vRNPs).

El virus codifica varias proteínas que se expresan durante la infección pero no se han detectado en el virión: NS1, PA-X, PB1-F2 y N40. La proteína NS1 posee diversas funciones en las diferentes fases del ciclo de infección. En etapas tempranas de la infección se acumula en el núcleo mientras que en etapas tardías está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo (Briedis et al, 1981). Resulta fundamental para la inhibición de la respuesta antiviral mediada por interferón que se desencadena en la célula huésped (Kochs et al, 2007), para la modulación del *splicing* del mRNA viral (Garaigorta & Ortin, 2007), la inhibición del *splicing* celular (Qiu et al, 1995), el procesamiento del extremo 3' (Chen et al, 1999) y la inhibición del transporte núcleo-citoplasma de los mRNAs celulares (Fortes et al, 1994). Además modula la actividad de la polimerasa viral (Hatada et al, 1997; Hatada et al, 1992; Marión et al, 1997), participa en la morfogénesis (Garaigorta et al, 2005) e inhibe la maquinaria de defensa celular (Bucher et al, 2004; Cheng et al, 2009a; Hatada et al, 1999; Kochs et al, 2007; Mibayashi et al, 2007). La proteína PB1-F2 se sintetiza a partir de una fase de lectura alternativa en el mRNA derivado del segmento 2. Se localiza en la membrana mitocondrial y se la ha relacionado con procesos de apoptosis (Gibbs et al, 2003). En 2009 se identificó una nueva proteína no estructural, N40, sintetizada a partir de un codón de iniciación alternativo en la secuencia del mRNA del segmento 2. El péptido resultante es una versión truncada de la proteína PB1 que no tiene actividad transcriptasa y aunque no es esencial para la viabilidad del virus, su eliminación disminuye la replicación en ciertos fondos genéticos (Wise et al, 2009).

Recientemente se han caracterizado tres nuevas proteínas derivadas del segmento 3 del virus, PA-X, PA-152 y PA-182. PA-X modula la respuesta de la célula hospedadora y se la ha relacionado con la virulencia del virus (Jagger et al, 2012). Aún se desconoce la función de PA-152 y PA-182 aunque se ha observado que no presentan actividad polimerasa al expresarlas con el resto del complejo de la polimerasa (PB1 y PB2) y la patogenicidad y replicación en virus mutantes que no expresan ambas proteínas disminuye significativamente (Muramoto et al, 2012).

3.2 El RNA viral

Durante la infección por el virus de la gripe se encuentran tres tipos de RNAs distintos dentro de la célula infectada, todos ellos generados por la polimerasa viral:

3.2.1 vRNAs o RNAs genómicos

Forman el genoma viral y son 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Los 13 primeros nucleótidos del extremo 5' y los 12 últimos del extremo 3' son comunes a todos

los segmentos y presentan una complementariedad parcial e invertida formando una estructura de mango de sartén o *panhandle* (Robertson, 1979; Skehel & Hay, 1978). El vRNA siempre se encuentra empaquetado en forma de RNPs junto a la proteína NP y el complejo de la polimerasa formando así una doble hélice antiparalela donde las NP de hebras opuestas interaccionan entre sí (Arranz et al, 2012) (**Figura I5B**).

3.2.2 cRNAs o RNAs complementarios

Son la copia completa del vRNA en polaridad positiva y se generan como intermediarios en el proceso de replicación. Al igual que el vRNA se encuentran formando cRNPs, pero éstas nunca salen del núcleo (Shapiro et al, 1987) (**Figura I5B**).

3.2.3. mRNAs o RNAs mensajeros

Son producto de la transcripción del vRNA llevada a cabo por la polimerasa viral y por lo tanto son de polaridad positiva. Son copias incompletas ya que carecen de la zona complementaria al extremo 5' del vRNA. En su lugar, en su extremo 3' poseen una cola de poliA que se genera por la copia reiterada que realiza la polimerasa viral de un tramo de uridinas presente cerca del extremo 5' del vRNA. En el extremo 5' poseen una estructura CAP que el virus secuestra de mRNAs celulares producidos por la RNA Polimerasa II gracias a la actividad nucleolítica de la subunidad PA de la polimerasa viral (Dias et al, 2009; Krug et al, 1976; Yuan et al, 2009) (**Figura I5B**).

3.3 El ciclo de infección

3.3.1 Entrada del virus en la célula

El virus de la gripe infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados por medio de la interacción de la proteína viral HA y el ácido siálico presente en la membrana celular (Skehel & Wiley, 2000; Weis et al, 1988). El virus entra en la célula por un mecanismo de endocitosis y tras la formación de una vesícula endocítica, ésta se fusiona con endosomas. La acidez de esta vesícula favorece un cambio conformacional de la proteína HA que favorece la fusión de la envuelta del virión y la membrana endolisosomal y la entrada de protones a través de M2 (Helenius, 1992; Pinto et al, 1992) produciendo la desestabilización de la interacción de las RNPs con M1 (Skehel & Wiley, 1995; Stegmann et al, 1987a; Stegmann et al, 1987b). Todos estos eventos permiten la liberación de las vRNPs paternas que gracias a sus secuencias de localización nuclear viajan al núcleo dónde tiene lugar su transcripción y replicación (Boulo et al, 2007) (**Figura I6**).

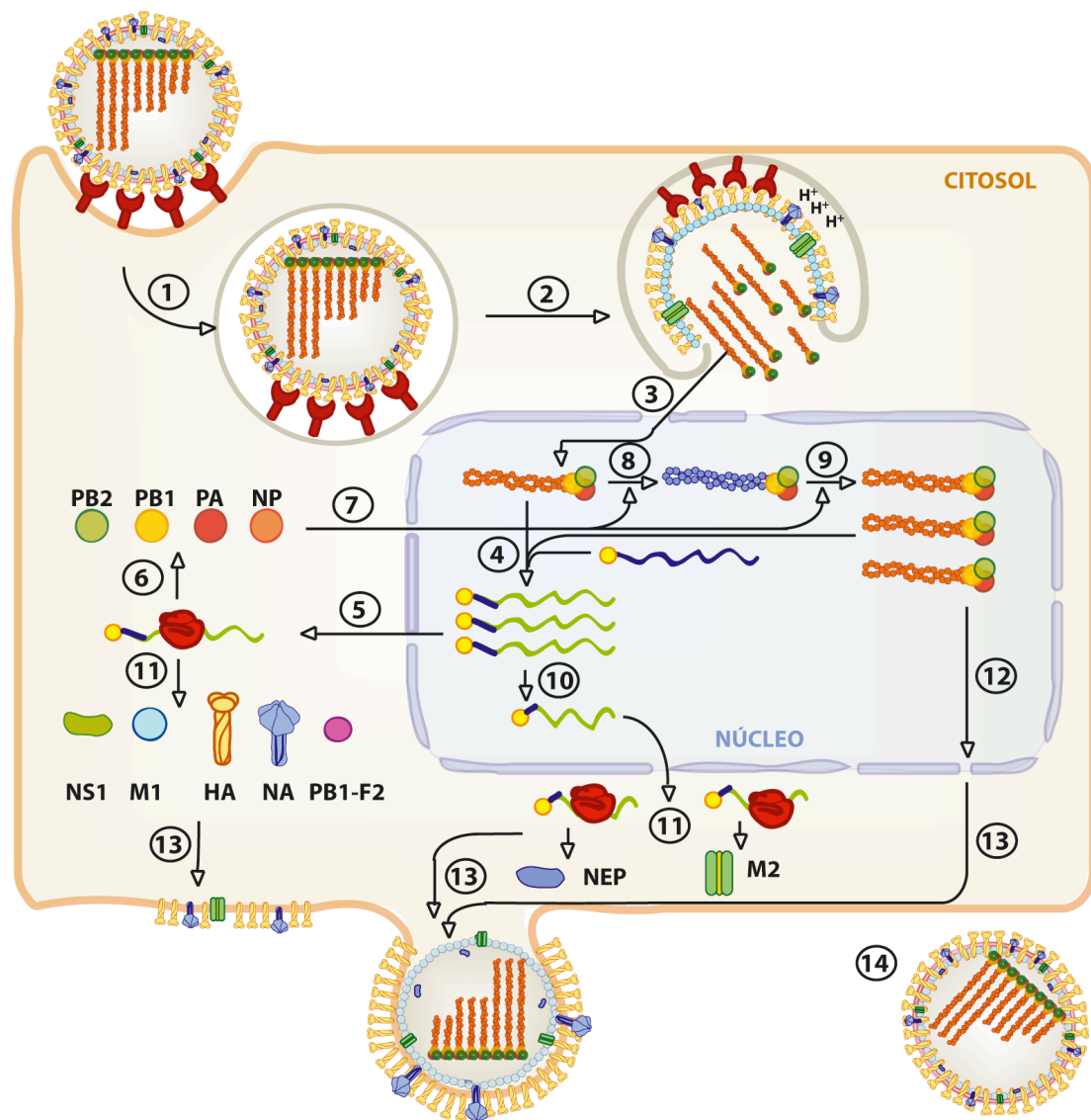


Figura 16: Ciclo de infección viral. Esquema de los pasos de la infección del virus de la gripe. Se representan los mRNAs celulares en azul, los mRNAs virales en verde, las cRNPs en azul y las vRNPs en naranja. 1) Al unirse a la superficie celular el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptor. 2) El bajo pH del endosoma desencadena la fusión de las membranas virales y endosomales, liberando las RNP al citoplasma. 3-4) Las vRNPs se importan al núcleo, donde sirven como molde para la transcripción. 5-6) Las nuevas proteínas son sintetizadas desde el mRNA viral. 8-9) En la replicación se generan los RNAs intermediarios de polaridad positiva (cRNA) 12-13). Las nuevas RNP se exportan del núcleo al citoplasma y se transportan al sitio de ensamblaje, donde las partículas virales se liberan mediante gemación (Adaptado de Jorba et al, 2009).

3.3.2 Transcripción y replicación

Tras la entrada de las RNP al núcleo tiene lugar un primer paso de transcripción en el que se sintetizan cantidades similares de todos los mRNAs virales a partir de las vRNPs paternas (Shapiro et al, 1987) sin el requerimiento previo de nuevas proteínas virales. El inicio de la transcripción requiere un fragmento de RNA con estructura CAP celular que la polimerasa viral

utiliza como cebador. Estudios de transcomplementación genética en los que se ha intentado rescatar el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción han permitido determinar que la síntesis del mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP (Jorba et al, 2009). Los mRNAs generados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular generando proteínas virales algunas de las cuales entran en el núcleo para realizar los procesos de replicación.

La replicación viral se inicial con la síntesis del cRNA a partir del vRNA en cantidades equivalentes para cada segmento. Sin embargo, la amplificación de los vRNAs a partir de estos moldes es diferente para cada uno (Smith & Hay, 1982). El proceso de transcripción a partir de estos nuevos vRNAs constituye la transcripción secundaria y la síntesis de las proteínas correspondientes son proporcionales a la acumulación del vRNA del que proceden (Krug et al, 1989; Smith & Hay, 1982). Los procesos de transcripción secundaria y replicación, que inicialmente están fuertemente acoplados, según avanza la infección se desacoplan y las vRNPs presentes en el núcleo son exportadas al citoplasma para la generación de la nueva progenie viral.

3.3.3 Traducción

Los mRNAs virales son transportados al citoplasma de la célula infectada de manera muy rápida y eficaz a través de la membrana nuclear (Shapiro et al, 1987). Además, los mRNAs virales se traducen más eficazmente que los mRNAs celulares, sobre los que el virus provoca una regulación negativa, reduciendo drásticamente su traducibilidad (Garfinkel & Katze, 1992; Katze & Krug, 1990; Yanguéz & Nieto, 2011). Esta regulación negativa en el citoplasma, junto con otros procesos principalmente nucleares, contribuye a un efecto global de inhibición de la síntesis de proteínas de la célula infectada conocido como *shut off* (Beloso et al, 1992; Vreede et al, ; Yanguéz & Nieto, 2011).

3.3.4 Morfogénesis, ensamblaje y liberación de nuevas partículas

En la fase tardía del ciclo viral empieza la formación de nuevas partículas virales. Las vRNPs transportadas desde el núcleo al citoplasma deben ser guiadas a través de filamentos de actina hasta sitios concretos de la membrana plasmática ricos en colesterol llamados lipid rafts (Ali et al, 2000; Avalos et al, 1997). Se ha propuesto que la proteína M1 es el principal organizador del ensamblaje de nuevos viriones (Gomez-Puertas et al, 2000; Gomez-Puertas et al, 1999), aunque también se ha implicado a la proteína M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006; McCown & Pekosz, 2006). El empaquetamiento del genoma viral requiere de la

incorporación de las 8 vRNPs para generar viriones infectivos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido de las 8 vRNPs, que se seleccionan y organizan mediante señales de empaquetamiento en su secuencia siguiendo una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central en el interior de la partícula (Hutchinson et al, 2010; Nayak et al, 2009; Noda & Kawaoka, 2010; Noda et al, 2006). Las partículas virales salen de la célula por gemación, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica. Por último, la proteína NA procesa los receptores del ácido siálico que el virus ha arrastrado de la membrana celular, evitando la agregación y facilitando la dispersión de las partículas virales (Liu et al, 1995; Palese et al, 1974).

Objetivos

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral son:

- 1-** Caracterización de la participación de hStaufen1 en procesos de represión de la traducción mediados por miRNAs.
- 2-** Análisis del papel de hStaufen1 durante la diferenciación neuronal.
- 3-** Estudio del papel de hStaufen1 durante la infección por el virus de la gripe.

Materiales y Métodos

1-MATERIALES BIOLÓGICOS

1.1 Líneas celulares

- **HEK293T**: Células embrionarias de riñón humano (Graham et al, 1977). Cedidas por J.C. de la Torre.
- **SHSY5Y**: Línea celular de neuroblastoma humano (Biedler et al, 1978), obsequio de P.Villacé.
- **A549**: Células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard et al, 1973), cedidas por J.A. Melero.
- **MDCK**: Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (Madin & Darby, 1958), cedidas por T. Zürcher y obtenidas de la ATCC.

1.2 Estirpes Bacterianas

- ***E. coli* DH5 α** . Cepa de *Escherichia coli* utilizada para la amplificación de todos los plásmidos.

1.3 Virus

- **A/WSN/33 (WSN)**: Cepa humana del virus de la gripe (H1N1) adaptada a crecer en cerebro de ratón.
- **VSV**: virus de la estomatitis vesicular del serotipo New Jersey, cedido por M. Esteban.
- **L-Trip**: Lentivirus recombinante que contiene los extremos del pre-miRNA miR-30.
- **L-Trip-iStau1**: Lentivirus recombinante que contiene el silenciador del mRNA del gen hStaufen1 flanqueado por los extremos del miRNA miR-30.

1.4 Plásmidos

- **pCTAP/pChStaufen1-TAP/pCmut1-TAP**: Plásmidos que contienen el cDNA que codifica la etiqueta TAP o bien la proteína hStaufen1 silvestre o mutante en el tercer dominio de unión a RNA de hStaufen1 fusionados a la etiqueta TAP (*Tandem Affinity Purification*) descritos en (Villacé et al, 2004) y (de Lucas et al, 2010) respectivamente.
- **pIRESneo-FLAG/HA Ago1, Ago2 y Ago3**: Plásmidos que contienen el cDNA que codifica las proteínas Ago1, 2 o 3 respectivamente, fusionadas a las etiquetas Flag y HA en su extremo N terminal (Meister et al, 2004). Cedidos por T. Tuschl.

- **pTRIPZ:** Plásmido lentiviral de segunda generación que contiene los extremos del pre-miRNA miR-30 bajo el control de un promotor de CMV inducible por doxiciclina (Open Biosystem RHS4750).
- **pTiStau1:** Plásmido lentiviral de segunda generación que contiene un shRNA silenciador del mRNA de hStaufen1 bajo el control de un promotor de CMV inducible por Doxiciclina.
- **pMD2-G:** Plásmido que contiene el cDNA que codifica la proteína G de VSV. Cedido por A. Fraile-Ramos (Addgene plasmid 12259).
- **p8.91:** Plásmido que contiene el cDNA que codifica las proteínas gag, pol, tat y nef del virus HIV. Cedido por A. Fraile-Ramos.
- **pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA, pCMV-NP:** Plásmidos que contienen, respectivamente, el cDNA de las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa Victoria del virus de la gripe, bajo el promotor CMV de la RNA polimerasa II celular. Fueron contruidos y cedidos por J. Ortega (Falcón et al, 2005; Mena et al, 1994).
- **pHHNS1:** Plásmido que contiene el vRNA del segmento NS de la cepa A/Victoria/3/75 (H3N2) del virus de la gripe (Garaigorta et al, 2005).

1.5 Anticuerpos

- **Tubulina-β3:** Anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo β3 de la proteína humana tubulina (SIGMA T5076).
- **hStaufen1:** Suero policlonal generado por la inmunización de conejos con la proteína hStaufen1, descrito en (Marión et al, 1999).
- **Actina:** Anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular actina (Abcam ab8227).
- **RCK/p54:** Anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular RCK/p54 (MBL PD009).
- **Ago2:** Anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína celular Ago2 (Abcam ab57113).
- **NP:** Suero policlonal generado por la inmunización de conejos con la proteína NP, generado y cedido por N. Zamarreño (Guilligay et al, 2008).
- **M1-M2:** Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente a un epítipo amino-terminal común para las proteínas M1 y M2 del virus de la gripe. Fue cedido por A. García-Sastre (Salvatore et al, 2002).
- **PB1:** Suero policlonal generado por la inmunización de conejos con la proteína PB1, generado y cedido por N. Zamarreño (Jorba et al, 2009).

- **PB2 y PA:** Los anticuerpos monoclonales que reconocen las proteínas PB2 y PA, han sido descrito previamente (Bárcena et al, 1994; Ochoa et al, 1995).

| Anticuerpo/Reactivo | Procedencia | Dilución WB | Dilución IF |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| hStaufen1 | Ratón | 1:3000 | 1:400 |
| Actina | Conejo | 1:1000 | |
| HA | Ratón | 1:1000 | |
| PB1 | Conejo | 1:1000 | |
| PB2 (20C/22A) | Ratón | 1:200 | |
| PA-9 | Ratón | 1:500 | |
| NP | Conejo | 1:5000 | |
| M1-M2 | Ratón | 1:200 | |
| Ago2 | Ratón | 1:400 | 1:200 |
| RCK/p54 | Conejo | 1:500 | 1:100 |
| Tubulina β3 | Ratón | | 1:1000 |
| α-tubulina | Conejo | | 1:1000 |
| ERGIC | Conejo | | 1:250 |
| γ-tubulina | Conejo | | 1:200 |
| WGA Alexa-594 | | | 1:200 |
| Faloidina | | | 1:400 |
| Digoxigenina | Ratón | | 1:100 |
| Anti-Ratón Alexa 488 | Cabra | | 1:400 |
| Anti-conejo Alexa 594 | Cabra | | 1:400 |
| Anti-Ratón Alexa 647 | Cabra | | 1:400 |
| Anti-Conejo peroxidasa | Cabra | 1:40000 | |
| Anti-Ratón peroxidasa | Cabra | 1:3000 | |

Tabla M1: Anticuerpos y reactivos utilizados en *Western Blot* (WB) y en inmunofluorescencia (IF) y la dilución utilizada en cada caso.

2-MÉTODOS

2.1 Manipulación de DNA y clonajes

2.1.1 Construcción de un plásmido lentiviral silenciador del gen hStaufen1

Se partió del plásmido original pTRIPZ (Open Biosystem RHS4750). Por un lado se generó un DNA sintético mediante la hibridación de 4 oligonucleótidos que contienen los extremos generados por el corte con las enzimas de restricción EcoR I y Xho I y un shRNA de 103 pares de bases que contiene la secuencia del silenciador del mRNA de hStaufen1 (véase Figura M1).

Para ello se fosforilaron los extremos 5' de los oligonucleótidos iStau1_2S y iStau1_4R (**Tabla M2**) y se anillaron con iStau1_1S y iStau1_4R. Por otro lado, se digirió el plásmido pTRIPZ con las enzimas anteriores y se realizó la ligación con el DNA sintético. Se procedió a la transformación del plásmido en células *E.coli* DH5 α y la selección de clones positivos.

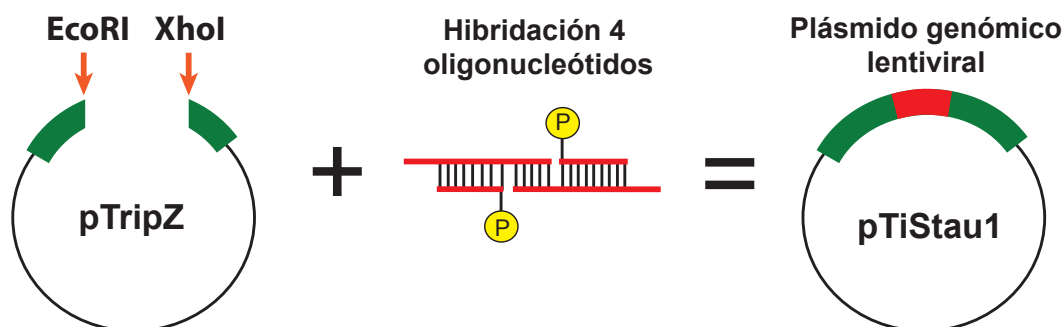


Figura M1: Esquema de la construcción del plásmido pTiStau1. Se digirió el plásmido pTripZ con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Se anillaron los 4 oligonucleótidos que contenían la secuencia silenciadora del gen de hStaufen1. Se ligó el DNA sintético con el plásmido digerido.

2.2 Análisis de cultivos celulares

2.2.1 Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares HEK293T y A549 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y aminoácidos no esenciales. La línea celular MDCK se cultivó en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y con SFB al 5%. La línea celular SHSY5Y se cultivó en medio RPMI suplementado con SFB al 10% y glutamax 2 mM (Invitrogen 35050-079). Para el subcultivo de las líneas celulares A549, MDCK y SHSY5Y se utilizó tripsina-EDTA. La línea celular HEK293T se subcultivó diluyendo la solución tripsina-EDTA al 10% en PBS. Todas las líneas celulares utilizadas se cultivaron a 37°C y con una concentración de CO₂ del 5%.

2.2.2 Transfecciones celulares

Las transfecciones de los diferentes plásmidos se realizaron en cultivos subconfluentes de células HEK293T utilizando fosfato cálcico según el protocolo descrito previamente (Wigler et al, 1979). Brevemente, para la transfección de $3 \cdot 10^7$ células se mezclaron 20-30 μ g de DNA en 1500 μ l de CaCl₂ y la mezcla se añadió gota a gota sobre 1500 μ l de solución HBS (50mM de HEPES, 1,5 mM Na₂PO₄ y 140mM de NaCl). Después de homogeneizar la mezcla, se incubó

durante 1 minuto y posteriormente se añadió sobre el cultivo celular gota a gota. Se incubó a 37°C y a las 48 horas se recogieron las células.

Para la reconstitución de las RNPs del virus de la gripe se transfectaron células HEK293T con fosfato cálcico con una mezcla de plásmidos que codificaban las 3 subunidades de la polimerasa, NP y un RNA pseudoviral con el gen del segmento NS del virus de la gripe en polaridad negativa. Para $1 \cdot 10^7$ células se transfectaron 3 µg de pCMV-PB1, 3 µg de pCMV-PB2, 0,6 µg de pCMV-PA, 12 µg de pCMV-NP y 6 µg de pHH-NS.

2.3 Técnicas virológicas

2.3.1 Infecciones virales

Las infecciones con la cepa WSN del virus de la gripe y con el virus VSV se realizaron a una multiplicidad de infección (MDI) de 10^{-3} unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula). Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes subcultivadas el día anterior. Se retiró el medio de cultivo de las células y tras un lavado con PBS completo (PBSc) se añadió el inóculo viral. Éste se preparó en PBS completo suplementado con 5µg/ml de seroalbúmina bovina (SAB). La adsorción se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el inóculo de virus y se incubaron las células con DMEM.

2.3.2 Generación de stocks de virus de gripe

Se infectaron monocapas de células MDCK a baja MDI (10^{-3} o 10^{-4} UFP/célula). Tras 36-40 horas de incubación a 37°C y cuando el efecto citopático observado alcanzó el 50% de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 2500 rpm para retirar los restos celulares y se guardaron congelados a -80°C.

2.3.3 Titulación de virus mediante ensayo en placa

Las células MDCK se infectaron con diluciones decimales seriadas de virus preparadas con PBSc suplementado con 5µg/ml de SAB y se incubaron durante 60 horas a 37°C en un medio semisólido que contenía DMEM, 0,7% agar, 1% DEAE-dextrano. Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído y se tiñeron con una solución de cristal violeta para realizar un recuento de placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO} = (\text{Nº placas} \cdot 1/\text{Factor de dilución}) \cdot (1/\text{volumen del inóculo vírico (ml)})$$

2.3.4 Curvas de crecimiento viral

Se infectaron monocapas de células A549 a baja MDI y se recogieron alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos post-infección: 0, 24, 36, 48 y 60 horas en el caso de infecciones por el virus de la gripe y 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas en infecciones por el virus VSV. Posteriormente se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes mediante la titulación por ensayo de placa. Se llevaron en paralelo triplicados de cada punto de la cinética viral. La muestra analizada por duplicado proviene de la mezcla de los triplicados.

2.3.5 Generación de lentivirus

Las células HEK293T se transfectaron en un frasco de 75cm² al 70% de confluencia. Cinco horas antes de la transfección se añadió DMEM fresco con SFB al 10%. En la transfección se añadieron 3 µg de los plásmidos empaquetadores p8.91 y pMD2-G y 5 µg de los plásmidos genómicos pTRIPZ o pTiStau1 (**Figura M2**). A las 24 horas se reemplazó el medio y a las 48 horas post-transfección se recogió el sobrenadante y se centrifugó 3 minutos a 2500 rpm. Por último se filtró a través de filtros de 0,45 µm (Millipore).

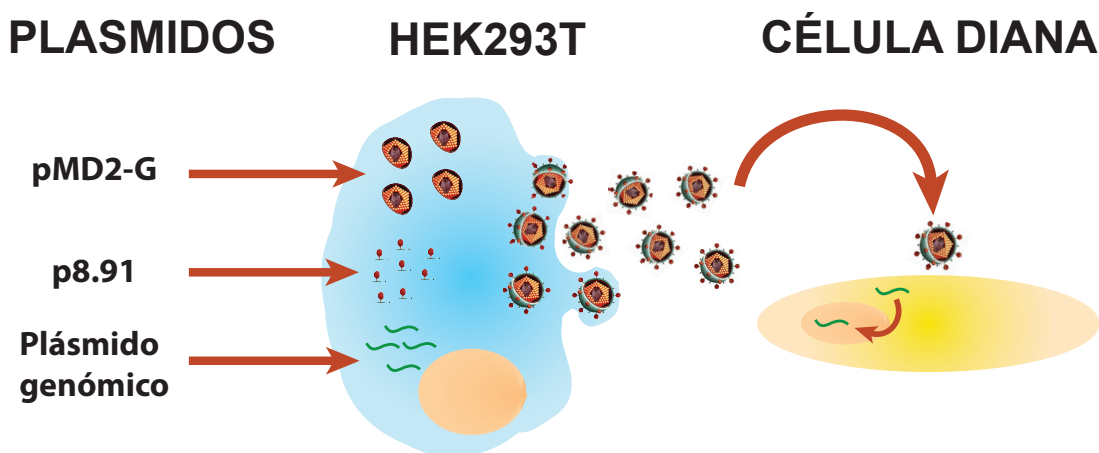


Figura M2: Esquema de la generación de lentivirus y la transducción en células. Las células HEK293T se transfectaron con los plásmidos empaquetadores pMD2-G, p8.91 y el plásmido genómico del lentivirus. Una vez generados, se realizó la transducción de las células diana. La generación de una línea estable se realizó mediante la selección con puromicina de células que contienen el lentivirus.

2.3.6 Purificación de viriones

Se infectaron células A549 a baja MDI (10^{-3} UFP/célula) y se obtuvieron los sobrenadantes a las 60 h.p.i. Se centrifugaron sobre un gradiente de capas de sacarosa del 33% y del 50% en TNE durante 60 minutos a 40000 rpm a 4°C en un rotor SW41. Se recuperó la interfase entre

ambas capas, se diluyó en la misma solución y se precipitó mediante centrifugación en un colchón de sacarosa del 33% durante 60 minutos a 40000 rpm a 4°C en un rotor SW41 tal y como se describió previamente en (Garaigorta et al, 2005). Para determinar la composición proteica, el sedimento obtenido se resuspendió en solución Laemmli y se analizó mediante *Western Blot*.

2.4 Diferenciación de células SHSY5Y

Las células de neuroblastoma humano se diferenciaron en placas tratadas con Matrigel. Para ello se incubaron en medio DMEM con 10 µM de ácido retinoico, 2mM de glutamina y 1% de SFB durante 5 días, cambiando el medio cada dos días. A continuación se sustituyó este medio por Neurobasal (GIBCO) suplementado con B-27 (GIBCO) conteniendo 2mM de dibutilil AMPc (SIGMA), 50 ng/ml de BDNF (Alomone), 2mM de Glutamax y 20mM de KCl (Merck) y se prosiguió la incubación durante 5 días más (Gimenez-Cassina et al, 2006).

2.5 Análisis de la longitud y el número de las dendritas de células SHSY5Y

El análisis dendrítico se realizó utilizando el programa informático Image J con el *plugin* Neuron J (Meijering et al, 2004). Se trazaron manualmente las prolongaciones neuronales y los puntos de bifurcación. El segmento de la prolongación neurítica que se origina directamente en el soma y se extiende hasta el primer nodo de bifurcación se denomina rama de primer orden. Las ramas que se generan de un nodo de primer orden son ramas de segundo orden y así sucesivamente. En conjunto, estas variables se interpretan como índices de la complejidad neurítica. El análisis estadístico se realizó utilizando la t-Student. Se consideraron valores significativos aquellos con un *p-value* menor o igual a 0,05.

2.6 Análisis de RNAs

2.6.1 Extracción de RNA total

El RNA total celular se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen). Se utilizó 1 ml de Trizol por cada $1,6 \cdot 10^6$ células. Una vez el cultivo estuvo homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió 0,2 ml de cloroformo y se homogeneizó. La mezcla se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa y se añadió 1,5 ml de isopropanol. Se precipitó el RNA a -20°C durante 12 horas. Pasado este tiempo se centrifugó la muestra a 12000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol 75%. Se centrifugó de nuevo la

muestra y se descartó el sobrenadante. El RNA se resuspendió en 20 µl de H₂O tratada con dietilpirocarbonato.

2.6.2 Extracción de RNA de los complejos purificados

El RNA asociado al complejo de hStaufen1 se aisló mediante tratamiento con proteinasa K (125 µg/ml) en TNE con un 0,5% de SDS durante 1 hora a 37°C. Tras una extracción con fenol-cloroformo, el RNA se precipitó con 3 volúmenes de etanol a -20°C durante 12 horas.

2.6.3 RT-PCR

2.6.3.1 TaqMan de miRNAs

Screening: Se realizó utilizando las placas Multiplex RT-qPCR TaqMan MicroRNA Assay A v.2 (Applied Biosystem). La versión A contiene los 384 miRNAs más comunes expresados en células humanas. Se utilizó tanto RNA total celular como el RNA obtenido tras la purificación por TAP para realizar la reacción de RT-qPCR TaqMan. Una vez obtenidos los valores de Ct para cada miRNA se calcularon las diferencias de Cts entre los valores de las muestras TAP y hStau1-TAP. Para discriminar los datos, se utilizó como referencia el valor de la diferencia de Cts entre la muestra TAP y la muestra hStau1-TAP correspondiente al RNA de pequeño tamaño U6, presente en la placa Multiplex como control interno.

RT-qPCR TaqMan individuales: Se llevaron a cabo las reacciones de síntesis de cDNA (RT) utilizando *loop-primers* específicos para mir-124, mir-24, mir-339, mir-345, mir-9, mir-93 o mir-487a y el kit comercial TaqMan miRNA RT Master MIX (Applied Biosystem) utilizando como molde 10 ng de RNA. La reacción de RT se realizó durante 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima. La qPCR TaqMan se realizó con el kit comercial Universal Master Mix II no UNG (Applied Biosystem). Las condiciones de la reacción de qPCR TaqMan fueron 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima seguido de cuarenta ciclos formados cada uno de ellos por 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

2.6.3.2 RT-PCR semicuantitativa

Se realizó utilizando el kit comercial TITAN ONE tube (Roche). La reacción de RT se realizó durante 30 minutos a 50°C, seguido de 2 minutos a 95°C para inactivar la enzima AMV. Las rondas de PCR consistieron en ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, con una extensión final de 7 minutos a 68°C. Se realizaron 30 ciclos para los genes CTSB y EEFD1 y 35 ciclos para PGLS. Se utilizaron diluciones seriadas de

los RNAs para asegurar que la amplificación tenía un rango lineal. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción se indican en la **Tabla M3**.

| Gen | Polaridad | Oligonucleótidos |
|-------|-------------|----------------------|
| EEFD1 | sentido | cggatccggaagctacaga |
| | antisentido | gcgatatcgacactctgcac |
| CTSB | sentido | agaatggcacaccctactgg |
| | antisentido | tccagccaccacttctgatt |
| PGLS | sentido | aagattgtggctcccatcag |
| | antisentido | tccagttgccacaaagatga |

Tabla M3: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los mRNAs asociados a hStaufen1 por RT-PCR semicuantitativa. Se indican para cada gen los 2 oligonucleótidos utilizados (sentido y antisentido).

2.6.4 Análisis transcriptómico

El cDNA se sintetizó a partir de 4 µg de RNA total o asociado a Staufen1-TAP. Se usó como iniciador de la reacción un oligonucleotido dTTP que contenía el promotor de la polimerasa T7 en su extremo 3'. Tras un tratamiento con RNasa H, el cDNA de doble banda se purificó y se utilizó como molde en la reacción de transcripción in vitro utilizando el kit comercial One-cycle targets y reactivos de control (Affimetrix) para producir cRNA marcado con biotina. El cRNA marcado se lavó, se fragmentó (35-200 nt) y se hibridó con el chip Human Genome U133 Plus 2.0. Este chip contiene más de 54000 transcritos y 38500 genes caracterizados (Affimetrix). Cada muestra se añadió a la solución de hibridación que contenía 100mM 2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico, 1M Na⁺, y 20mM de EDTA en presencia de 0,01% de Tween-20 con una concentración final de cRNA de 0,05 µg/ml. La hibridación se realizó durante 16 horas incubando 200 µl de cada muestra con MOE 430 2.0 chips a 45°C. Cada microarray se marcó con estreptavidina-ficoeritrina utilizando Fluidics station 450 (Affimetrix) y se escaneó a 11 µm de resolución en el GeneChip® Scanner 3000 7G System (Affymetrix). El análisis de los datos se llevó a cabo usando GeneChip Operating Software (GCOS).

2.6.5 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Las ribosondas utilizadas para la hibridación se generaron mediante transcripción in vitro de un producto de PCR linealizado de cDNA que contiene en los extremos las secuencias de los promotores de las RNA polimerasas SP6 y T3. Se añadió la RNA polimerasa correspondiente y se incubó durante 2h a 37°C en una mezcla de reacción conteniendo UTP-Digoxigenina (DIG

RNA labeling mix, Roche). Se trató el producto con la DNasa I durante 15 minutos a 37°C. Las sondas marcadas se purificaron añadiendo LiCl 4M y Et-OH 100% y se precipitaron a -80°C durante 30 minutos.

Las células se fijaron con paraformaldehído 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron 5 minutos con Tritón X-100 0,1%. Se incubaron 100 ng de sonda desnaturalizada por muestra durante 8 horas a 42°C en una solución con 500 µg/ml de tRNA, 100 µg/ml de ssDNA, 300mM NaCl, TE 1X, Denhardt 1X, 10% sulfato de dextrano y 50% formamida. Se realizaron lavados con una solución SSC 2X a 42°C durante 15 minutos seguido de otro con 500mM NaCl, TE 1X pH=8 durante 2 minutos y se trataron con RNasa A en la misma solución. Se lavaron de nuevo con esta última solución para después realizar dos nuevos lavados durante 15 minutos con la solución SSC 2X y SSC 1X sucesivamente. Se procedió a su detección inmunológica con los anticuerpos correspondientes según el **apartado 2.7.5. de Materiales y Métodos**.

2.7 Análisis de proteínas

2.7.1 Obtención de extractos citoplasmáticos

Los extractos citoplasmáticos se obtuvieron mediante la lisis de los cultivos celulares durante 30 minutos a 4°C con el siguiente tampón: 50mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 0,5% IGEPAL, 1mM DTT, coctel de inhibidores de proteasas (Roche) y 10 unidades cada 10⁷ células del inhibidor de RNasa RNasin (Promega). Los cultivos lisados se clarificaron mediante centrifugación a 2500 rpm durante 3 minutos a 4°C y el sobrenadante fue centrifugado de nuevo durante 10 minutos a 10.000 rpm y a 4°C para eliminar los posibles agregados.

2.7.2 Purificación de la proteína etiquetada con TAP

Para la obtención de los complejos que contienen la proteína hStaufen1-TAP, el extracto citoplasmático de las células se incubó con resina de IgG-Sepharosa (100 µl de volumen de lecho; aproximadamente 5 µl de resina por mg de proteína) durante 12 horas a 4°C. La resina se lavó 10 veces con 1 ml de un tampón que contiene 150mM de NaCl, 10mM de Tris HCl, 0,1% IGEPAL, pH 8.0 y después se lavó 5 veces con 1 ml de una solución que contiene 150mM de NaCl, 10mM Tris HCl, 0,1% IGEPAL, 0,5mM EDTA, pH 8.0. El material unido a la resina se digirió con 1 unidad cada 10⁷ células de la proteasa del virus TEV (Invitrogen) durante 2h a temperatura ambiente en el mismo tampón. El sobrenadante resultante del corte con la proteasa se mezcló con 5 lavados sucesivos de la resina con un tampón compuesto por 150mM NaCl, 10mM Tris HCl, 0,1% IGEPAL, 10mM 2-Mercaptoetanol, 1mM Mg(AcO)₂, 1mM imidazol, 2mM CaCl₂, pH 8.0 y se incubó durante 12 horas a 4°C con resina calmodulin-

agarosa. La resina de calmodulina-agarosa se lavó 10 veces con el mismo tampón y se eluyó con un tampón que contiene 10mM Tris HCl, 0,1% IGEPAL, 10mM 2-Mercaptoetanol, 1mM Imidazol y 3mM EGTA pH 8.0. Se realizaron sucesivas eluciones con 30 μ l del tampón de elución. Tras un minuto de incubación con el tampón se centrifugó a 3000 rpm y se guardaron los eluidos a -20°C.

2.7.3 Western Blot

El análisis de proteínas se realizó mediante su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado y se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore). Los filtros se bloquearon con una solución de SAB al 3% en PBS previamente a su incubación con los anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de PBS 0,05% Tween 20 y 0,1% BSA. Las diluciones de los anticuerpos utilizados se resumen en la **Tabla M1**. Se incubaron las membranas durante una hora a temperatura ambiente y tras 3 lavados con PBS-0,25% Tween 20 se incubaron con los anticuerpos secundarios preparados en PBS 0,05% Tween 20 y 0,1% SAB. La señal en los filtros se detectó mediante reacciones de quimioluminiscencia.

2.7.4 Cromatografía de exclusión molecular

El fraccionamiento de los complejos celulares se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular. Tras lavar la columna con dos volúmenes de H₂O se equilibró la resina Sephacryl S400 (SIGMA) en el mismo tampón del extracto celular. La relación entre el volumen de muestra y el volumen de resina fue de 1:50. Se recogieron 50 fracciones de aproximadamente 40 μ l. La columna se calibró con catalasa (0,22 MDa) y ribonucleoproteínas del virus de la gripe purificadas de viriones (de 6,5 a 2,8 MDa) en el mismo tampón que la muestra. Los marcadores se revelaron por *Western Blot* con anticuerpos anti-NP y con tinción con PageBlue (Fermentas) según las recomendaciones del fabricante.

2.7.5 Microscopia confocal de inmunofluorescencia

Los cultivos celulares se fijaron durante 20 minutos en PBS completo conteniendo paraformaldehído al 3%. Tras la fijación, se permeabilizaron las células con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 5 minutos. Las preparaciones se bloquearon con 2% SFB en PBS durante 1 hora y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario preparado a la dilución adecuada en 0,1% SFB en PBS. Después de lavar dos veces con PBS, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario utilizando las mismas condiciones. En los experimentos se realizó un doble marcaje fluorescente utilizando la combinación adecuada de anticuerpos anti-IgG de

conejo o de ratón generados en cabra y marcados con los fluoróforos Alexa 546, Alexa 488 o Alexa 647. Finalmente, las preparaciones se montaron en Prolong y se analizaron en un microscopio Leica TCS SP5 spectral system. Las imágenes de 512x512 píxeles se obtuvieron con un objetivo 63X. Se obtuvieron secciones ópticas cada 0,2 μm y se procesaron con el software de Leica LASAF.

2.8 Silenciamiento génico

Para realizar el silenciamiento génico de la proteína hStaufen1 se han utilizado dos abordajes distintos, por un lado el silenciamiento mediante la transfección de siRNAs dirigidos frente a hStaufen1, y por otro la generación de lentivirus que expresan un silenciador en un sistema regulable por doxiciclina .

2.8.1 Silenciamiento mediante siRNAs

El silenciamiento se realizó en células A549. Se sembraron $2 \cdot 10^5$ células en una placa M24, con el objetivo de que al día siguiente tuviera una confluencia de entre el 60-80%. Se realizaron las transfecciones en dos días consecutivos. En cada ocasión, se incubaron 1,5 μl de Lipofectamina en un volumen final de OPTIMEM de 50 μl a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esta preparación se mezcló con 50 μl de OPTIMEM que contenía los siRNAs a una concentración de 1 μM (la concentración final de los siRNAs en el medio de cultivo fue de 100 nM) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añadió al cultivo celular que contenía 400 μl de DMEM con el 10% de FBS y se incubó durante 6 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se retiró el medio con la solución de transfección y se dividió el cultivo en dos placas M24. A las 24 horas post-transfección se realizó una segunda transfección siguiendo el mismo protocolo anterior. Tras incubar 24 horas se dividieron las células en dos placas M24 y se incubaron durante 24 horas más. El silenciamiento se analizó mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos para cada proteína. Los siRNAs fueron adquiridos a Ambion. Se adquirieron 3 silenciadores diferentes, S1, S2 y S3 (**Tabla M4**), diseñados por la casa comercial, así como los del control negativo y hnRNPM usado como control positivo. Los siRNAs se reconstituyeron en H_2O a una concentración de 100 μM .

| Proteína | Secuencia 5'→3' | Región diana en el mRNA |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| hStaufen1 (S1) | GGACUAGUAAUAAAGAGGAtt | 1412-1431 |
| hStaufen1 (S2) | GAACGAAUUUGUAUCUCUUt | 1820-1839 |
| hStaufen1 (S3) | GGCUGUAGGAGUUAGUCAAtt | 1556-1575 |
| hnRNPM | GGAAGGAGAAAAACAUAAAtt | 187-206 |
| CTRL – (ref: AM4611) | No facilitada por la casa comercial | |

Tabla M3: Secuencias de los siRNAs y región diana en el mRNA del gen de hStaufen1. Se indican los 4 silenciadores que se utilizaron para el silenciamiento de las células A549 por transfección. La última columna indica la región donde hibrida cada silenciador en el mRNA del gen diana.

2.8.2 Silenciamiento mediante transducción lentiviral.

Para la transducción lentiviral de las células SHSY5Y, éstas se sembraron en un frasco de 25 cm² al 30-50% de confluencia. Se realizó una mezcla de transducción que contenía 1 ml del lentivirus generado con 1 ml de RPMI conteniendo un 10% de SFB. La mezcla se añadió sobre las células sembradas y se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 2 ml de medio fresco RPMI con un 10% de FBS. Se incubaron las células durante 48 horas. Pasado ese tiempo se retiró el medio y se añadió medio fresco que contenía 1 µg/ml de puomicina. De esta forma, se seleccionaron las células que habían integrado el genoma del lentivirus. Posteriormente, se añadió medio nuevo con 1 µg/ml de doxiciclina, que induce la expresión del siRNA. El silenciamiento de hStaufen1 alcanzó su valor máximo 72 horas después del tratamiento con doxiciclina.

| Nombre | Oligonucleótidos |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| iStau1_1S | 5'-TCGAGTGTCTGTGACAGTGAGCGATCTGAGACTGACTTTATCAATTAGTGAAGCCACAGA-3' |
| iStau1_2S | 5'-TGTAATTGATAAAGTCAGTCTCAGACTGCCTACTGCCTCGGAG-3' |
| iStau1_3R | 5'-AATTCTCCGAGGCAGTAGGCAGTCTGAGACTGACTTTATCAATTACATCTGTGGCTTCAC-3' |
| iStau1_4R | 5'-TAATTGATAAAGTCAGTCTCAGATCGCTCACTGTCAACAGCAC-3' |

Tabla M4: Oligonucleótidos utilizados para la generación del shRNA silenciador de la proteína hStaufen1. En amarillo se indican la secuencias libres después del corte con las enzimas EcoRI y XhoI. La zona en rojo indica la secuencia del silenciador del mRNA del gen hStaufen1. iStau1_1S e iStau1_2S forman a la hebra sentido del total del inserto de 103 pares . iStau1_3R e iStau1_4R corresponden a la hebra antisentido.

Resultados

1-ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS DE hSTAUFEN1

La proteína hStaufen1 forma complejos ribonucleoproteicos que participan en el transporte, la represión y la traducción localizada de mRNAs (Barbee et al, 2006; Villacé et al, 2004). Sin embargo la naturaleza de los mRNAs presentes y su mecanismo de unión a estos complejos no están claramente definidos. Por tanto uno de los Objetivos de esta Tesis es analizar tanto las proteínas como los RNAs asociados al complejo.

1.1. Asociación de proteínas del RISC a los complejos de hStaufen1

1.1.1. Análisis de la interacción de las proteínas del RISC con los complejos de hStaufen1

En neuronas motoras de *D. melanogaster* se ha descrito que Staufen1 colocaliza con proteínas implicadas en el metabolismo de mRNAs y en la regulación de su traducción (Barbee et al, 2006). Entre ellas también se encuentra la proteína Ago2 que pertenece a la familia Argonauta y forma parte del complejo RISC, responsable de la regulación de la traducción mediada por miRNAs. Estos datos podrían sugerir un mecanismo por el cual las proteínas del RISC tuvieran un papel en la regulación del contenido de mRNAs y/o la represión de su traducción en los gránulos de hStaufen1. Para determinar si en células humanas se producía una interacción similar, se analizó la presencia de las proteínas Ago1, Ago2 y Ago3 en los complejos de hStaufen1. Para ello se cotransfectaron células HEK293T con los plásmidos que expresan el mRNA que codifica las proteínas Ago1-HA, Ago2-HA o Ago3-HA junto al plásmido que expresa la proteína hStaufen1 unido a la etiqueta TAP o sólo la etiqueta TAP como control negativo. Después de los dos pasos de cromatografía por afinidad del protocolo TAP se analizaron los productos purificados mediante *Western Blot* con anticuerpos que reconocen específicamente la etiqueta HA o la proteína hStaufen1. En el panel A de la **Figura R1** se muestra la presencia de las proteínas Ago1-HA, Ago2-HA y Ago3-HA en la muestra hStaufen1-TAP purificada, mientras que no se observa en el control negativo TAP. Estos resultados muestran que las proteínas Ago1-HA, Ago2-HA y Ago3-HA se asocian a los complejos de hStaufen1-TAP de manera específica.

La proteína Ago2 es la más estudiada dentro de la familia Argonauta y contiene la actividad nucleasa responsable de la degradación de mRNAs dependiente de miRNAs. Por otra parte, la proteína RCK/p54 es una helicasa de RNA que participa en los complejos de represión y degradación de mRNAs y está presente en los gránulos PB. Por ello, se analizó la posible asociación de ambas proteínas a los complejos de hStaufen1-TAP. Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos que codifican Staufen1-TAP o TAP como control negativo. Se llevó

a cabo la purificación de los extractos celulares mediante la etiqueta TAP y los materiales purificados se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos para las proteínas Ago2, RCK/p54 o hStaufen1. La **Figura R1B** muestra que ni Ago2 ni RCK/p54 pudieron ser detectadas en los complejos hStaufen1 purificados. Dado que el rendimiento de la purificación por TAP es bajo y la expresión endógena de Ago2 y RCK/p54 podría no ser suficiente para detectarlas en los productos purificados finales por *Western Blot*, se analizaron los eluidos después del tratamiento de la resina de IgG con la proteasa TEV. Tal y como se observa en la **Figura R1C**, la proteína Ago2 estaba asociada a los complejos de hStaufen1-TAP pero no se observó la presencia de RCK/p54. Estos resultados sugieren que existe una interacción entre las proteínas de la familia Ago y los complejos de hStaufen1, si bien ésta parece minoritaria en condiciones en las cuales Ago2 no está sobreexpresada.

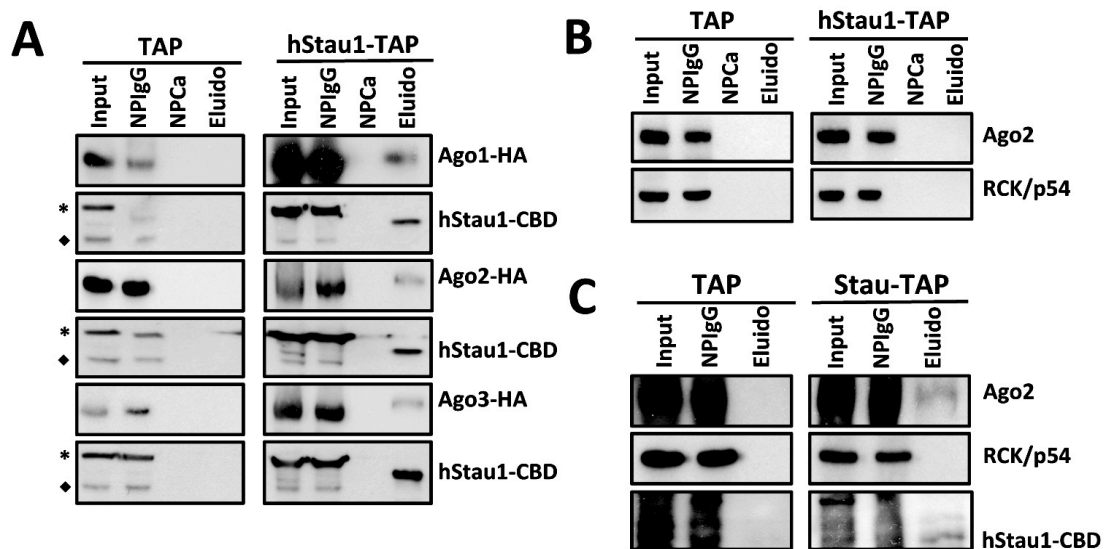


Figura R1: Asociación de los complejos de hStaufen1-TAP con las proteínas AGO1-HA, AGO2-HA y AGO3-HA así como con las proteínas endógenas AGO2 y RCK/p54 en células HEK293T. (A) Se cotransfectaron células HEK293T con los plásmidos pCTAP o pChStaufen-TAP con cada uno de los plásmidos que codifica las proteínas de la familia AGO (Ago1-HA, AGO2-HA y AGO3-HA) y se obtuvieron los extractos celulares. Se realizó una purificación utilizando el protocolo TAP y se analizaron los complejos purificados por *Western Blot* con anticuerpos específicos para hStaufen1 y HA. **(B)** Se cotransfectaron células HEK 293T con pCTAP o pChStaufen1-TAP y se analizaron los complejos purificados por TAP con anticuerpos específicos para Ago2 y RCK/p54. **(C)** Se realizaron purificaciones mediante la etiqueta TAP de células HEK293T transfectadas con pCTAP o pChStaufen-TAP hasta el tratamiento de la resina de IgG con la proteasa TEV y se analizaron los eluidos por *Western Blot* mediante anticuerpos que reconocen Ago2 y RCK/p54.

1.1.2 Colocalización de las proteínas del RISC con los complejos de hStaufen1

La proteína Staufen1 de *D. melanogaster* colocaliza con proteínas de P-Bodies en células neuronales (Barbee et al, 2006) Además, tal y como se ha observado, hStaufen1-TAP es capaz de interaccionar con proteínas del complejo RISC y P-Bodies en células humanas HEK293T. Por

tanto se analizó la posible colocalización de la proteína Ago2 con los complejos de hStaufen1 en células HEK293T y en células de neuroblastoma humano SHSY5Y. En el caso de los precursores neuronales se analizaron cultivos antes (día 0) y después del proceso de diferenciación a fenotipo neuronal (día 7). Se realizaron inmunofluorescencias utilizando anticuerpos específicos para las proteínas Ago2 y hStaufen1, se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal y se realizó un análisis de la posible colocalización de la señal de ambas proteínas. Tal y como se observa en la **Figura R2** no se detectó una colocalización de hStaufen1 con Ago2 en células HEK293T, SHSY5Y no diferenciadas o diferenciadas. Los pequeños puntos de colocalización observados resultaron ser estadísticamente no significativos según el coeficiente Pearson (menor de 0,50).

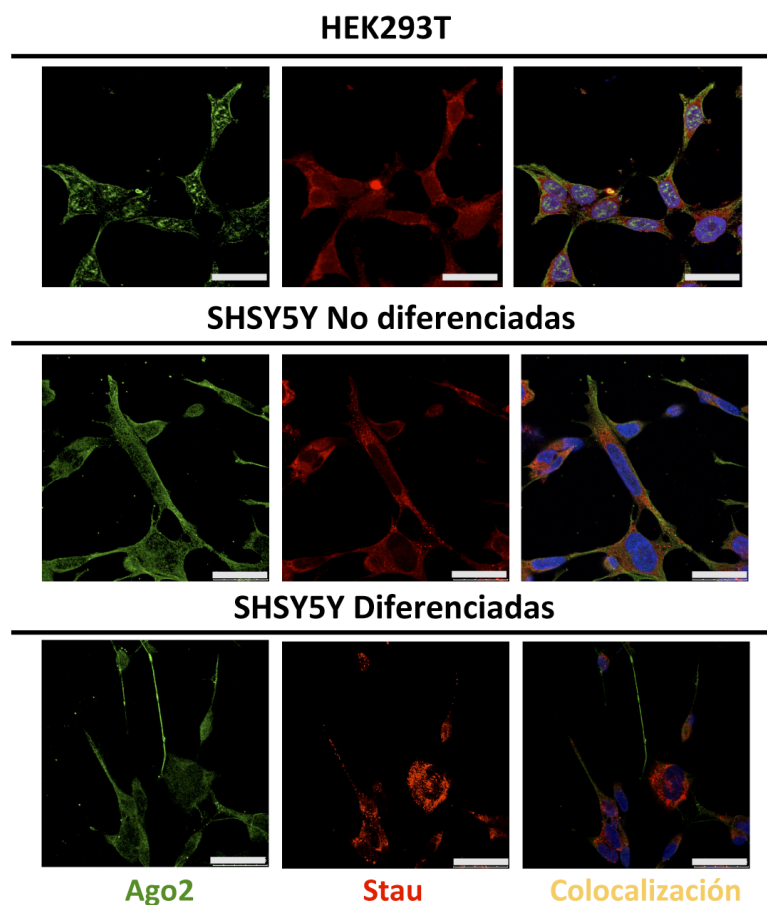


Figura R2: Colocalización de las proteínas Ago2 y hStaufen1 en inmunofluorescencia de células HEK293T, SHSY5Y no diferenciadas y diferenciadas. Se sembraron células HEK293T y SHSY5Y sin diferenciar y se realizó una cinética de diferenciación de una fracción de SHSY5Y hasta día 7. Se fijaron las células con formaldehído y se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos que reconocen Ago2 y hStaufen1. En verde se observa la señal que corresponde al anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa-488 que reconoce el el anticuerpo primario de Ago2 y en rojo la señal del anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa-549 que reconoce al primario de hStaufen1. Se utilizó el coeficiente de Pearson para determinar la especificidad de las co-localizaciones. En todos los casos el valor fue < 0,5. La barra de escala inferior de las imágenes corresponde a 25 μ m.

1.2 Análisis de los RNAs asociados al complejo.

Datos previos del laboratorio mostraron que los complejos de hStaufen1 unían RNAs de un tamaño heterogéneo (Villacé, P. Tesis Doctoral). Entre ellos, los RNAs asociados pequeños correspondían a los tamaños descritos para los RNAs no codificantes miRNAs (20-22nt) y sus precursores, pre-miRNAs (70nt). Estos resultados sugerían la posibilidad de la unión no sólo de mRNAs al complejo sino también de los miRNAs y sus precursores. Por ello se decidió analizar en profundidad la naturaleza de estos RNAs.

1.2.1 mRNAs asociados al complejo.

Para identificar qué mRNAs están asociados al complejo, se realizó un estudio transcriptómico. Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos que codifican la proteína hStaufen1-TAP o sólo la etiqueta TAP como control negativo. Después de los dos pasos de cromatografía de afinidad se extrajeron los RNAs del complejo. El control negativo TAP se descartó para el análisis transcriptómico como consecuencia de la ausencia de RNAs presentes después de la purificación. Se generó una librería de cDNAs, que se amplificaron y se analizaron mediante un chip de Affimetrix. Como referencia se procesó en paralelo el RNA total obtenido de células HEK293T. Este ensayo permitió analizar la posible presencia diferencial de los mRNAs de 38.500 genes humanos incluidos en el chip. El análisis de los datos obtenidos de tres experimentos independientes mostró que existía un alto número de mRNAs asociados al complejo. En el RNA total de células HEK2943T se detectan un 40% de los mRNAs incluidos en el chip, es decir, el transcriptoma de este tipo celular, mientras que se detecta un 16% de los mRNAs incluidos en el chip en las muestras de RNA asociado a hStaufen1. Como criterio de especificidad de la unión se comparó la relación entre la cantidad de un mRNA concreto en las 2 muestras. De esta forma se restringió el número de mRNAs candidatos a asociarse a hStaufen1 a un 7% del mRNA que se expresa en HEK293T (alrededor de 1000 mRNAs con una diferencia de representación de al menos 2 veces mayor en el RNA asociado a hStaufen1). Para restringir aún más, se seleccionaron los 66 mRNAs enriquecidos más de cuatro veces con respecto al control del RNA total en los complejos de hStaufen1 (**Anexo 1**, Material suplementario). Estos RNAs se clasificaron según su función celular utilizando la herramienta bioinformática Gene Ontology (**Figura R3**, panel A). Así se mostró que alrededor del 38% de los genes estaban implicados en la regulación de procesos biológicos, alrededor del 18% en procesos de desarrollo celular y multicelular, 10% en localización de proteínas y un 5% en localización celular.

Para verificar la presencia de estos mRNAs en el complejo, se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa diluciones seriadas (1/10 y 1/100) del RNA obtenido tras la purificación por TAP y además RNA total de células HEK293T usando como molde de la reacción de RT-PCR 100ng, 10ng y 1ng de RNA. Se utilizaron oligonucleótidos que reconocen las secuencias del cDNA de los mRNAs asociados PGLS, CTSB y EEFD1. Tal y como se muestra en el panel B de la **Figura R3** se detectaron los fragmentos de DNA correspondientes a los 3 mRNAs asociados al complejo, mientras que no estaban presentes en la muestra TAP, utilizada como control negativo. Estos datos confirmaban la presencia específica de estos mRNAs en los complejos de hStaufen1-TAP.

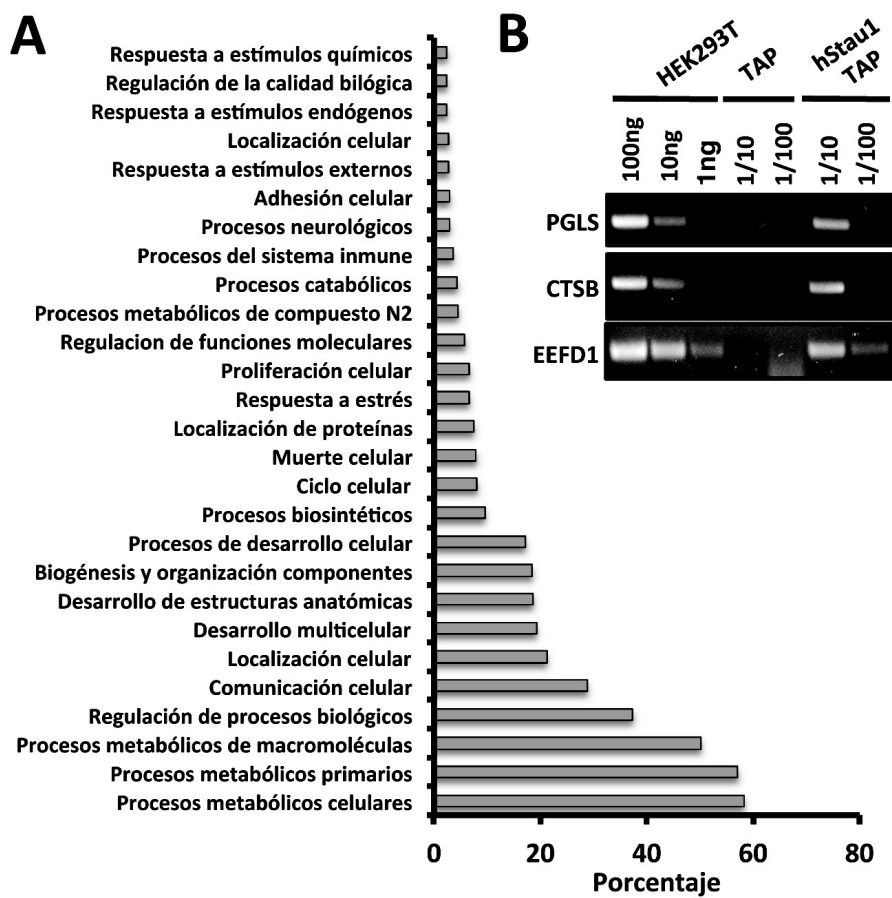


Figura R3: Análisis de los mRNAs asociados a los complejos de hStaufen1-TAP. Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCTAP o pChStaufen-TAP y se extrajeron los RNAs asociados de los extractos purificados por TAP (**A**). Se realizó un análisis transcriptómico y se seleccionaron los mRNAs asociados al complejo con un valor de *fold change* mayor o igual a 4. Se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar el Gene Ontology de los mRNAs candidatos mediante GeneCodis y se clasificaron según los procesos celulares en los que participan. La figura muestra el porcentaje de mRNAs incluidos en cada grupo con respecto al total. (**B**) Se realizaron RT-PCRs semicuantitativas de los RNAs utilizando oligonucleótidos que reconocen 3 mRNAs identificados como asociados al complejo (PGLS, CTSB y EEFD1) y se analizaron las diluciones 1/10 y 1/100 de las muestras en un gel de agarosa. En paralelo se analizó el RNA purificado de extractos totales de células HEK293T en cantidades conocidas utilizando los mismo oligonucleótidos.

1.2.2 miRNAs asociados al complejo de hStaufen1

1.2.2.1 Identificación de la asociación de miRNAs maduros

Los miRNAs son RNAs no codificantes de pequeño tamaño que hibridan con un mRNA diana para regular su traducción, reprimiendo la síntesis de la proteína codificada o degradando el transcrito. Este sistema de regulación traduccional se ha propuesto como uno de los responsables de la traducción localizada de algunos mRNAs en la célula. Teniendo en cuenta que hStaufen1 une mRNAs celulares, que se ha descrito su implicación en el transporte y traducción localizada de RNAs y que además hStaufen1 une RNAs que se corresponden con el tamaño descrito para miRNAs maduros (Tesis de Patricia Villacé) se decidió analizar la presencia de miRNAs en el complejo. Para ello, se purificaron los complejos que contienen hStaufen1 derivados de células HEK293T en las que se expresó hStaufen1-TAP o sólo la etiqueta TAP, tal y como se ha descrito antes, y se realizó un rastreo mediante RT-qPCR TaqMan (Applied) de los correspondientes RNAs asociados.

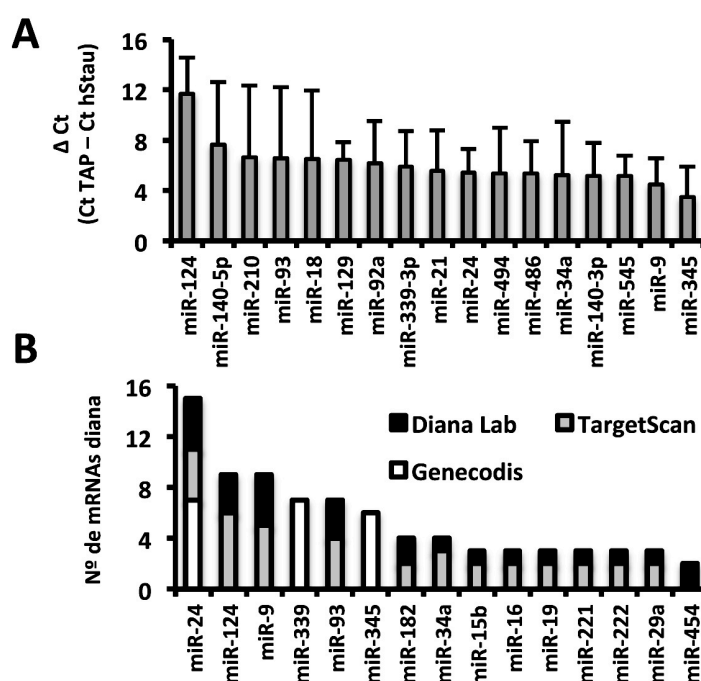


Figura R4: Análisis de los miRNAs asociados a los complejos de hStaufen1-TAP. (A) Se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCTAP o pChStaufen-TAP y se extrajeron los RNAs de los eluidos finales de la purificación por la etiqueta TAP. Se analizó mediante RT-qPCR TaqMan la presencia de 384 miRNAs. Se calculó la diferencia de ciclos entre la muestra TAP y hStaufen1-TAP de 3 muestras independientes y se representó en la gráfica en orden decreciente las diferencias de Cts mayores que 4, que corresponden a 17 miRNAs. (B) Se realizó un estudio bioinformático de predicción (Targetscan, DianaLab) y de bases de datos de estudios publicados (GeneCodis) para determinar las dianas de hibridación de los 17 miRNAs con los mRNAs obtenidos mediante el microarray. La gráfica muestra el número de mRNAs con dianas para los 17 miRNAs asociados a hStaufen1-TAP.

Este estudio permitió analizar la posible presencia de los 384 miRNAs más estudiados en células humanas. El análisis mostró que al menos 17 miRNAs se asociaban al complejo de hStaufen1-TAP de manera específica (**Figura R4**, panel A), esto es, mostraban un ΔCt superior a 3 al comparar los datos obtenidos para los complejos hStaufen1 y los controles. Estos datos junto a los obtenidos en el análisis transcriptómico de los mRNAs presentes en el complejo sugieren un papel de hStaufen1 en la regulación de la traducción de mRNAs mediada por miRNAs.

1.2.2.2 Selección de los miRNAs potencialmente más relevantes.

Dado que los miRNAs hibridan de forma parcial o totalmente complementaria con un mRNA diana para reprimir su traducción o inducir su degradación, se analizó mediante técnicas bioinformáticas de predicción algorítmica (TargetScan, DianaLab) y rastreo de datos publicados (Genecodis) si los mRNAs identificados mediante el análisis transcriptómico eran dianas de los 17 miRNAs asociados al complejo. El análisis mostró que todos los miRNAs tenían al menos 2 mRNAs diana (**Figura R4**, panel B) y permitió seleccionar los 6 miRNAs con mayor número de dianas como los miRNAs candidatos para continuar con el estudio (miR-124, miR-24, miR-339, miR-345, miR-9 y miR-93).

En primer lugar se verificaron los datos obtenidos en el rastreo de miRNAs asociados mediante ensayos de RT-qPCR TaqMan individuales para los 6 miRNAs seleccionados en múltiples muestras de complejos hStaufen1-TAP purificados a partir de células HEK293T que sobreexpresaban hStaufen1-TAP. El análisis mostró que los 6 miRNAs candidatos seleccionados mediante técnicas bioinformáticas están asociados específicamente a los complejos de hStaufen1-TAP en células HEK293T (**Figura R5**).

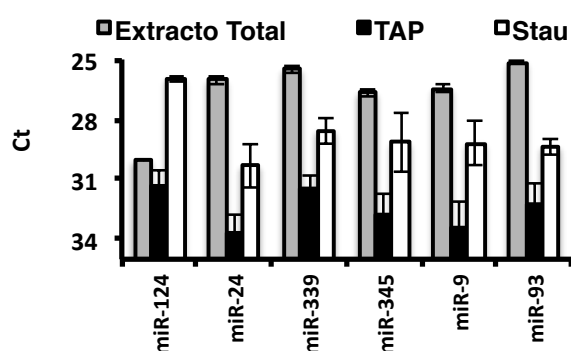


Figura R5: Asociación de los 6 miRNAs seleccionados a los complejos de hStaufen1-TAP. Se transfectaron células HEK293T con pCTAP o pChStaufen1-TAP y se llevó a cabo la purificación mediante la etiqueta TAP de los extractos celulares. Se aisló el RNA y se analizó la presencia de los 6 miRNAs seleccionados en el extracto total y en los eluidos de la muestra TAP y hStaufen1-TAP mediante RT-qPCR TaqMan.

En todos los casos se detectó mayor concentración de miRNAs en los complejos hStaufen1 que en los controles (entre 10 y 100 veces mayor; ΔCt entre 3 y 6). Para el miR-124, cuya concentración en el extracto inicial es la menor de las analizadas, se observó además que la concentración en el complejo de hStaufen1 era mayor que la detectada en el extracto inicial. Estos resultados sugieren que la asociación de miR-124 al complejo es mayor que el resto de miRNAs.

1.2.2.3 Análisis de los 6 miRNAs seleccionados en células de neuroblastoma humano.

Se ha descrito la colocalización de Staufen1 con proteínas relacionadas con la regulación de la traducción mediada por miRNAs en células neuronales de *D. melanogaster* (Barbee et al, 2006) y con proteínas motoras del citoesqueleto en células de neuroblastoma humano (Villacé et al, 2004). Además, estudios recientes han mostrado que mStaufen1 es importante para la correcta diferenciación neuronal en ratón (Vessey et al, 2008) y por otro lado, se han identificado miRNAs importantes para la diferenciación neuronal, tales como miR-124 y miR-9 (Yoo et al, 2009). Dado que estos 2 miRNAs se encuentran asociados al complejo de hStaufen1 en células HEK293T, se decidió analizar la posible relevancia de esta interacción en células de neuroblastoma humano. Mediante filtración de exclusión molecular se separaron por tamaño los diferentes complejos citosólicos celulares y se analizó la posible comigración de las proteínas Ago2 y RCK/p54 con los complejos endógenos que contienen hStaufen1. La presencia de estas proteínas a lo largo de la filtración se analizó mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos. Tal y como se muestra en el panel A de la **Figura R6**, los complejos formados por hStaufen1 tienen un tamaño de entre 6 y 10 MDa. En estas fracciones comigraban una pequeña subpoblación de las proteínas Ago2 y RCK/p54. Dado que Ago2 se une directamente a miRNAs y que RCK/p54 es una proteína que forma parte de los P-bodies, su presencia en los complejos de hStaufen1 podría ir acompañada de la presencia de miRNAs en dichas fracciones. Para analizar esta posibilidad directamente se reunieron las fracciones de la filtración en cuatro grupos: F1, fracciones correspondientes a los complejos de hStaufen1; F2, fracciones donde hStaufen1 estaba muy poco representada; F3, fracciones donde no aparece hStaufen1 pero se acumulan de forma mayoritaria las proteínas Ago2 y RCK/p54, y F4, fracciones solubles celulares donde tan sólo aparece una pequeña fracción residual de RCK/p54 y ninguna de las otras proteínas seleccionadas (Panel A, de la **Figura R6**). Se extrajo el RNA de cada grupo de fracciones y se realizaron determinaciones individuales de cada uno de los miRNAs seleccionados mediante RT-qPCR TaqMan. Tal y como se puede observar en el panel B de la **Figura R6**, los 6 miRNAs seleccionados se detectaron en las fracciones de hStaufen1. Sin embargo la distribución de cada miRNA a lo largo de la filtración fue distinta.

Así, mientras que miR-124 y miR-9 estaban representados preferentemente en las fracciones correspondientes a los complejos de hStaufen1, miR-24 presentaba una distribución uniforme a lo largo de la filtración y el resto de miRNAs analizados (miR-339, miR-345 y miR-93) estaban representados preferentemente en las fracciones dónde comigraban Ago2 y RCK/p54.

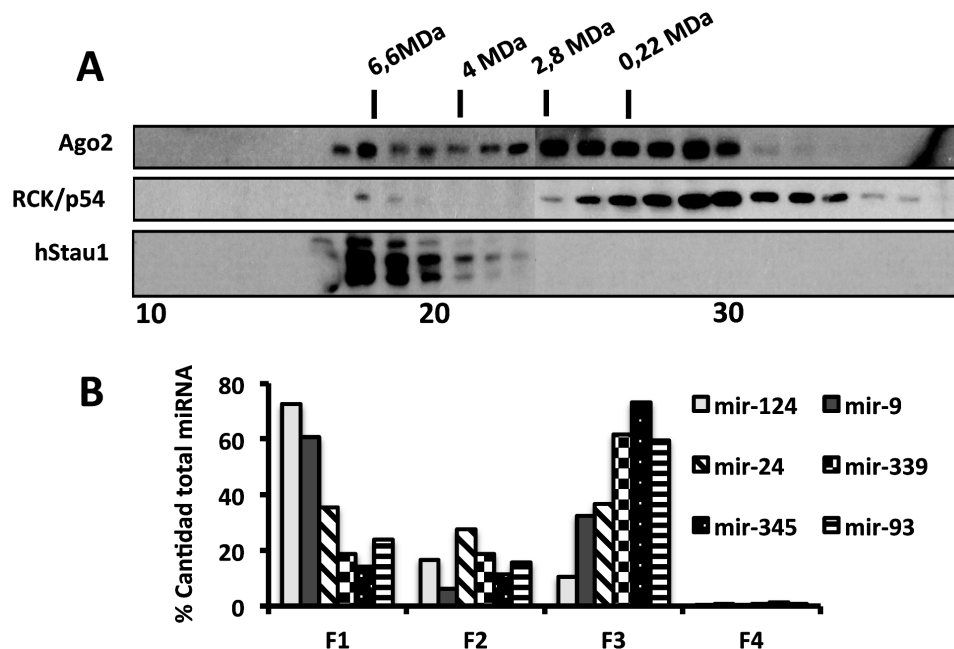


Figura R6: Asociación de los 6 miRNAs seleccionados a los complejos de hStaufen1 en células SHSY5Y. Se realizó una filtración de exclusión molecular mediante una columna de Sephacryl S-400 de extractos de células SHSY5Y y se obtuvieron las fracciones correspondientes. **(A)** Se analizó la composición proteica de cada fracción mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos que reconocen las proteínas Ago2, RCK/p54 y hStaufen1. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron ribonucleoproteínas purificadas de viriones del virus de la gripe y la proteína catalasa. **(B)** Se agruparon las fracciones en 4 grupos; F1 (17-18, fracciones positivas para hStaufen1), F2 (21,22,23 fracciones dónde hStaufen1 aparece poco representada), F3 (25-28 fracciones donde mayoritariamente aparecen Ago2 y RCK/p54, y no se detecta hStaufen1), y F4 (34-36, ausencia de Ago2 y hStaufen1, y RCK/p54 poco representada). Se extrajo el RNA y se determinó la presencia de los 6 miRNAs seleccionados mediante RT-qPCR TaqMan. La gráfica muestra el porcentaje de la cantidad total de cada miRNA a lo largo de los cuatro grupos de fracciones

1.2.2.4 Comparación de la asociación de los 6 miRNAs seleccionados a los complejos de hStaufen1 en células SHSY5Y con respecto al extracto inicial celular

Para analizar la unión de los miRNAs al complejo de hStaufen1 en células neuronales se realizaron filtraciones de exclusión molecular de células SHSY5Y. Se obtuvieron las fracciones donde migraba hStaufen1 (**Figura R7A**) y se extrajo el RNA. Posteriormente se analizó mediante RT-qPCR TaqMan la presencia de los miRNAs en dichas fracciones y en los RNAs totales correspondientes a los extractos celulares de partida. Por último se realizó una comparación entre los valores obtenidos en dichas fracciones con los valores obtenidos en el extracto inicial. Tal y como se puede observar en la **Figura R7B**, la comparación con el extracto total mostraba que la asociación de miR-124 era mayor que el resto de miRNAs, de manera

similar a lo observado en las purificaciones por TAP de células HEK293T. Para analizar si esta asociación se modificaba durante la diferenciación neuronal, se realizó el mismo experimento en células SHSY5Y diferenciadas. Se obtuvieron las fracciones correspondientes a los gránulos de hStaufen1 (**Figura R7C**), se extrajo el RNA y se analizó la presencia de los 6 miRNAs para compararlo con los valores obtenidos en el extracto inicial. Tal y como se puede observar en la **Figura R7D** la asociación de miR-124 a dichas fracciones disminuía mientras que el resto de miRNAs mantenían valores similares a los obtenidos en células sin diferenciar. El cambio en la asociación de miR-124 en las fracciones correspondientes a los gránulos de hStaufen1 era significativa obteniendo un p-value en la t-Student $\leq 0,05$ (**Figura R7**).

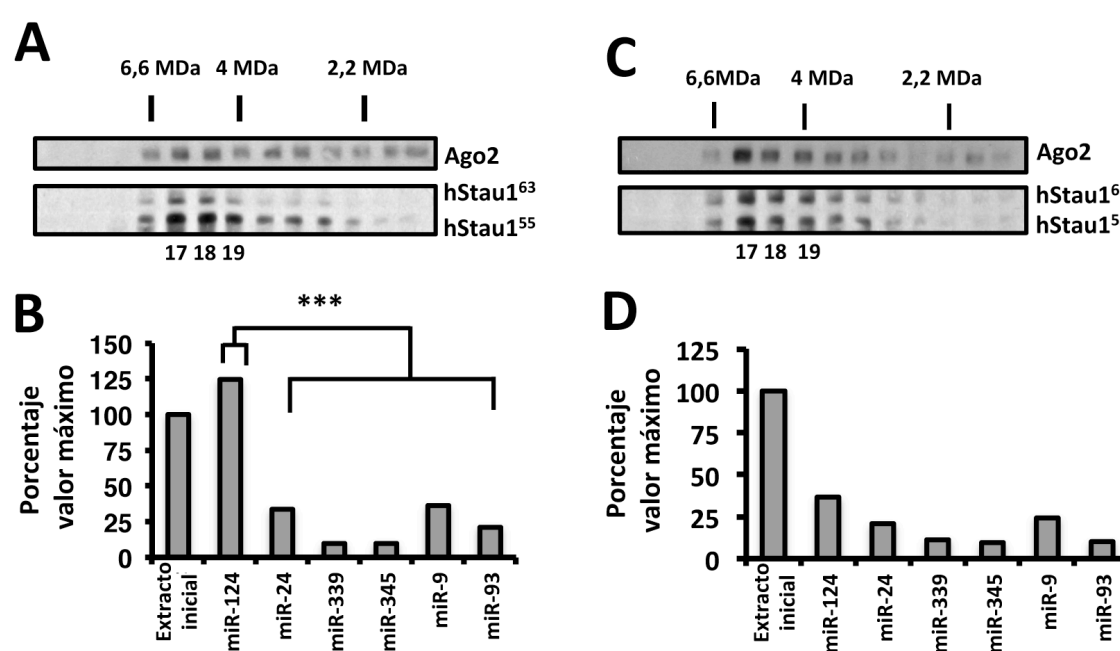


Figura R7: Comparación de la asociación de los 6 miRNAs seleccionados a los complejos de hStaufen1 en células SHSY5Y respecto al extracto inicial celular. Se realizó una filtración de exclusión molecular mediante una columna de Sephacryl S-300 de extractos de células SHSY5Y sin diferenciar (**A**) y diferenciadas (**C**) y se obtuvieron las fracciones correspondientes. Se analizó la presencia de las proteínas Ago2 y las isoformas de hStaufen1 (hStau⁵⁵ y hStau⁶³) mediante *Western blot* con anticuerpos específicos que reconocen dichas proteínas. Se agruparon las fracciones 17,18 y 19 y se aisló el RNA contenido en estas fracciones de las células sin diferenciar (**B**) o diferenciadas (**D**) y en el extracto inicial. Se analizó mediante RT-qPCR TaqMan la cantidad de los 6 miRNAs candidatos con respecto al extracto inicial de tres réplicas independientes. El eje de ordenadas muestra el porcentaje del valor máximo.*** p-value $\leq 0,01$

1.2.2.5 Análisis de miR-124 durante la diferenciación neuronal

Se ha descrito que durante la diferenciación neuronal en células de ratón aumenta la expresión de miR-124. Para analizar si en células humanas se producía este mismo efecto se obtuvieron los RNAs de extractos solubles de células SHSY5Y no diferenciadas (Día 0) y diferenciadas (Día 7) y se analizó mediante RT-qPCR TaqMan la expresión de miR-124. En el

panel A de la **Figura R8** se observa que los niveles de miR-124 aumentan durante la diferenciación aproximadamente 20 veces con respecto a las células sin diferenciar.

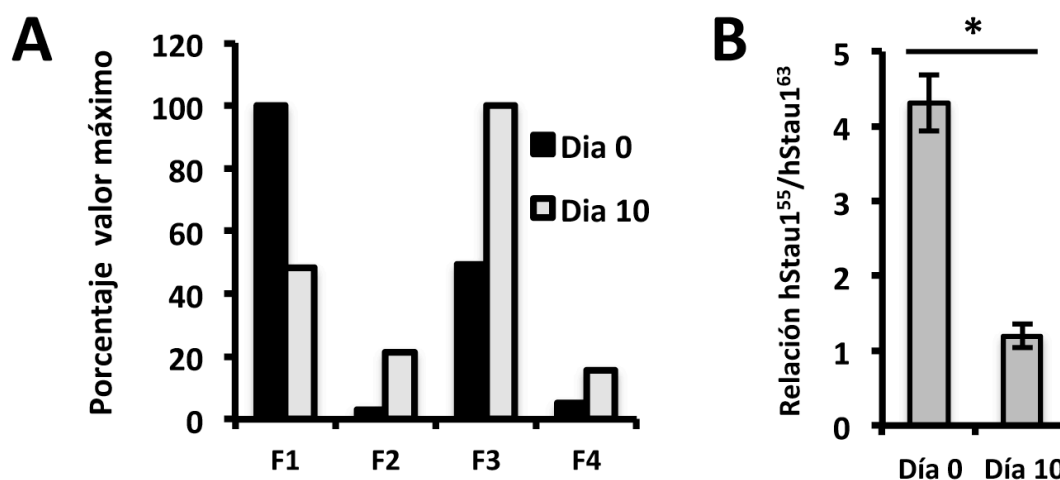


Figura R8: Análisis de la asociación de miR-124 a los complejos de hStaufen1 en células SHSY5Y y niveles de expresión en células diferenciadas y no diferenciadas. (A) Representación gráfica de la cantidad de miR-124 en las fracciones correspondientes a los gránulos de hStaufen1 con respecto al extracto inicial en neuroblastos diferenciados y no diferenciados (* p-value $\leq 0,05$). (B) Se sembraron células SHSY5Y y se indujo la diferenciación de una fracción de éstas. Se obtuvo el RNA total y se analizó la expresión de miR-124 por RT-qPCR TaqMan. La gráfica muestra el porcentaje del valor máximo de la expresión de miR-124 de células SHSY5Y diferenciadas y no diferenciadas.

Ya que la expresión de miR-124 aumenta durante la diferenciación, y sin embargo se produce una disminución de su presencia en las fracciones de hStaufen1, se decidió analizar la distribución de miR-124 a lo largo de la filtración en células diferenciadas y no diferenciadas. Para llevar a cabo el experimento se realizaron filtraciones de células SHSY5Y diferenciadas y no diferenciadas y se agruparon del mismo modo que en el **apartado 1.2.2.3 (Figura R6)** en cuatro grupos de fracciones. Se extrajeron los RNAs de dichos grupos y se analizaron por RT-qPCR TaqMan para detectar la presencia de miR-124. Se puede observar en la **Figura R9** que miR-124 se distribuye preferentemente en el grupo de fracciones F3 en células diferenciadas, donde se encuentra la mayor fracción de Ago2 y RCK/p54. Estos resultados muestran que durante la diferenciación, miR-124 aumenta su expresión y su distribución cambia hacia gránulos celulares de menor tamaño.

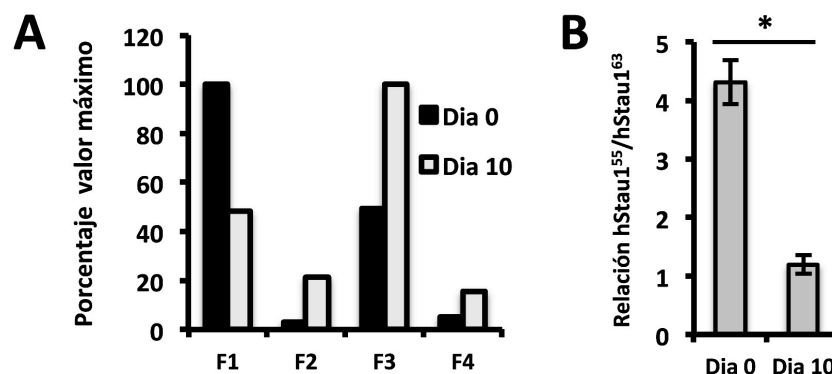


Figura R9: Presencia de miR-124 en los distintos gránulos celulares en células diferenciadas y no diferenciadas. (A) Se realizó una filtración de exclusión molecular mediante una columna de Sephacryl S-400 de extractos de células SHSY5Y sin diferenciar y diferenciadas durante 10 días y se agruparon las fracciones en 4 grupos según se indica en la figura R6. Se aisló el RNA de cada fracción y se analizó la presencia de miR-124 por RT-qPCR TaqMan. La gráfica muestra el porcentaje del valor máximo de la cantidad total de miR-124 de cada fracción (* p-value $\leq 0,05$). **(B)** Se realizó una filtración de exclusión molecular y las fracciones se revelaron con anticuerpos específicos para hStaufen1. Se cuantificó por densitometría las dos isoformas de hStaufen1, 55KDa y 63KDa, en células diferenciadas y no diferenciadas. El eje de ordenadas muestra la división entre la cuantificación de la isoforma de 55KDa y la de 63KDa. El eje de abscisas muestra los días de diferenciación. * indica un p-value $\leq 0,05$.

Como se ha podido observar en la **Figura R7**, la distribución de los complejos de hStaufen1 y Ago2 no cambia en células diferenciadas y no diferenciadas. Sin embargo, tal y como se puede apreciar en la **Figura R8A**, mientras que la isoforma de 55kDa de hStaufen1 se presenta como la mayoritaria en células sin diferenciar (Día 0), los niveles de las isoformas de 63kDa y 55kDa son prácticamente iguales en células diferenciadas (7 días) (**Figura R8C**). La cuantificación por densitometría de ambas bandas en las dos condiciones muestra como durante la diferenciación neuronal se produce un cambio en la expresión de las isoformas de hStaufen1 siendo mayoritaria la isoforma de 55kDa en células sin diferenciar y prácticamente iguales en células diferenciadas. (**Figura 9B**).

2-PAPEL DE hSTAUFEN1 EN DIFERENCIACIÓN NEURONAL

En los ratones transgénicos Stau1(tm1Apa), se observa una disminución en el número de ramificaciones dendríticas en células neuronales a partir del orden dendrítico secundario (Vessey et al, 2008). Por otra parte, se ha publicado que dos de los 6 miRNAs asociados a hStaufen1 en células neuronales (miR-124 y miR-9) son importantes para la correcta diferenciación de neuronas y son esenciales para la conversión de fibroblastos de ratón en células neuronales (Yoo et al, 2009; Yoo et al, 2011). Además, los resultados previos de esta Tesis indican que los niveles de miR-124 disminuyen en los complejos de hStaufen1 durante la

diferenciación neuronal en células de neuroblastoma humano. Todos estos datos sugieren que hStaufen1 podría participar en la correcta diferenciación de neuronas en humanos y por tanto se decidió estudiar su relevancia durante este proceso.

2.1 Generación de una línea estable de neuroblastoma humano silenciable para hStaufen1

Los neuroblastos son precursores neuronales que en presencia de determinados factores celulares en cultivo se diferencian a células neuronales. Para estudiar el papel de hStaufen1 durante la diferenciación se realizaron experimentos utilizando la estrategia de silenciamiento génico del mRNA que codifica hStaufen1. Para ello se generaron lentivirus recombinantes capaces de silenciar el gen de hStaufen1 de manera inducible en la línea celular de neuroblastoma humano SHSY5Y.

2.1.1 Generación de vectores lentivirales capaces de silenciar hStaufen1 inducibles por doxiciclina

Para la generación de los lentivirus recombinantes capaces de silenciar el mRNA de hStaufen1 se utilizó el plásmido pTRIPZ como vector genómico del lentivirus. Este plásmido contiene dos promotores. El promotor de la ubiquitina C que regula de forma constitutiva la expresión de un mRNA bicistrónico para el represor de tetraciclina rtTA3 seguido de una secuencia IRES y el gen de resistencia a puomicina. El otro promotor es un promotor CMV mínimo acoplado a varias secuencias de unión del represor del rtTA3. Así, en ausencia de tetraciclina en el medio, el represor permanece unido al DNA y reprime la activación del promotor CMV. Bajo este promotor está codificado el gen de la tRFP (*red fluorescent protein*) seguido de un armazón del miR-30 en el que se pueden insertar secuencias de silenciamiento específicas (**Figura R10**).

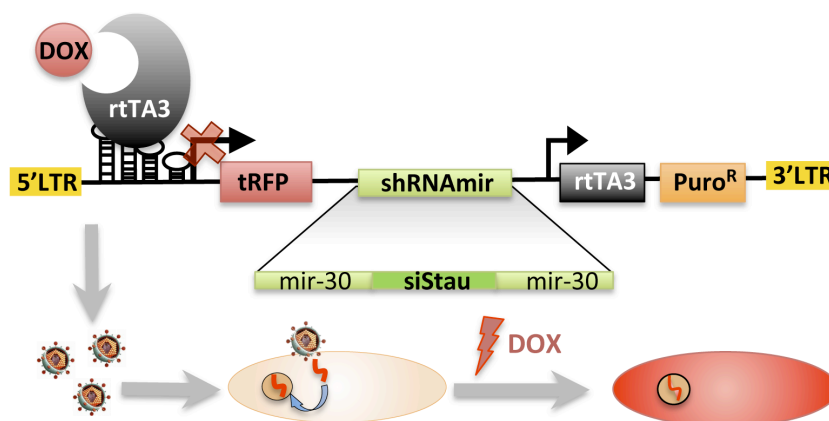


Figura R10: Esquema del plásmido lentiviral pTiStau1, la transducción y la expresión de tRFP de células diana. Las flechas indican la presencia de un promotor en la construcción. tRFP: Red fluorescent protein, rtTA3: Represor de tetraciclina, Puro^R: gen de resistencia a puomicina, DOX: doxiciclina, siStau: secuencia que hibrida con el gen de hStaufen1 y provoca su silenciamiento. miR-30: secuencias de los extremos 5' y 3' del pre-miR-30. LTR: secuencias de inserción del virus HIV.

Se generaron 3 plásmidos genómicos utilizando 3 fragmentos de DNA sintético que codifican 3 shRNAs con 3 secuencias candidatas a silenciar el mRNA de hStaufen1 (secuencias 1, 8 y 12). Esta construcción permite que en presencia de tetraciclina (o doxiciclina, su variante más estable) el promotor CMV se active expresando el mRNA que codifica la tRFP y el shRNA. Este último es procesado en el interior de la célula para generar el siRNA y presumiblemente silenciar el gen de la proteína hStaufen1. Para obtener los correspondientes lentivirus recombinantes se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pMD2-G y p8.91 con cada uno de los 3 plásmidos genómicos generados (pTiStau1 o pTiStau8 o pTiStau12) o bien el plásmido genómico pTRIPZ sin shRNA como control negativo. Los sobrenadantes de estos cultivos se usaron como fuente de lentivirus recombinantes silenciadores llamados L-Trip, L-Trip-iStau1, L-Trip-iStau8 y L-Trip-iStau12.

2.1.2 Silenciamiento inducible de hStaufen1 por doxiciclina

Para verificar la eficiencia del silenciamiento de los lentivirus recombinantes generados se transdujeron células HEK293T con las partículas virales rescatadas y se seleccionaron con 1 µg/ml de puromicina. Veinticuatro horas mas tarde se trataron con 1 µg/ml de doxiciclina y a las 24 horas siguientes, se observó la expresión de la proteína tRFP (Panel A de la **Figura 11**).

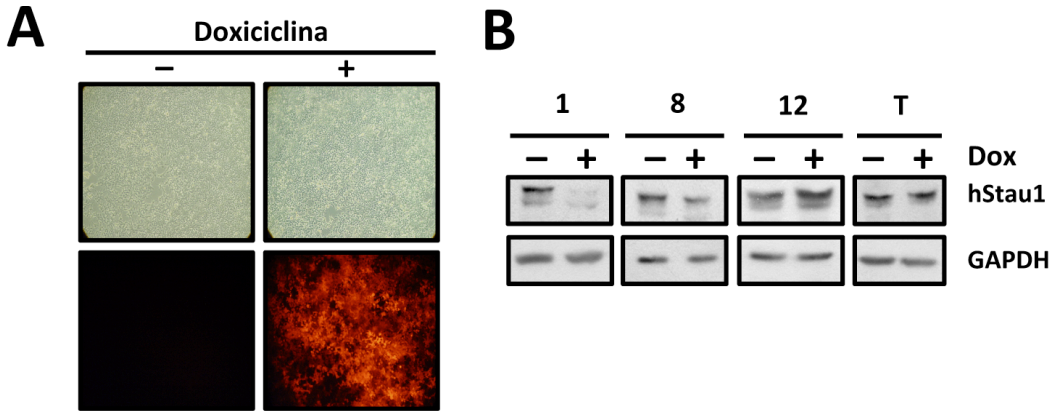


Figura R11: Silenciamiento de la línea celular HEK293T transducida con diferentes lentivirus silenciadores. Las células HEK293T se transdujeron con los lentivirus L-Trip (T), L-Trip-iStau1 (1), L-Trip-8 (8) y L-Trip-12 (12). Se seleccionaron con el antibiótico puromicina y se cultivaron en presencia o ausencia de doxiciclina durante 72h. **(A)** Se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia tanto de campo claro como con ultravioleta para observar la expresión de la tRFP. **(B)** Se obtuvieron los extractos celulares de las diferentes células transducidas, seleccionadas y tratadas (+) o no (-) con doxiciclina (DOX) y se realizó un *Western blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas GAPDH, como control de carga y hStaufen1.

Estos resultados indican que el promotor CMV se activa correctamente en presencia de doxyciclina en el medio. Para analizar si la expresión de la proteína hStaufen1 podía ser regulada por silenciamiento inducible se generaron extractos de las diferentes células HEK293T transducidas a las 72h de la adición de doxyciclina. Estos extractos fueron analizados mediante *Western Blot* con un anticuerpo específico de la proteína hStaufen1. Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce un epítipo de la proteína GAPDH. Tal y como se puede observar en el panel B de la **Figura R11** los silenciadores 1 y 8 producían una disminución en la expresión de la proteína de hStaufen1 mientras que el silenciador 12 y el plásmido sin shRNA (T) no producía cambios en su expresión. Se decidió elegir la secuencia 1 para estudios subsiguientes ya que era la que producía un mayor efecto en la expresión de hStaufen1.

2.1.3 Construcción de una línea estable de células de neuroblastoma humano silenciable para hStaufen1.

Una vez validado el silenciamiento de células HEK293T utilizando un lentivirus recombinante y seleccionado el mejor candidato, se transdujeron células SHSY5Y para generar una línea estable de neuroblastoma humano donde la expresión de hStaufen1 disminuyera en presencia de doxyciclina. Después de la transducción lentiviral de las células con cada uno de los lentivirus L-Trip-iStau1 y L-Trip como control negativo, las células se seleccionaron con el antibiótico puomicina. A los cultivos de células resistentes a puomicina se añadió doxyciclina y 72h más tarde se obtuvieron imágenes de microscopia de fluorescencia y extractos celulares, que fueron analizados por *Western Blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas β -actina y hStaufen1. Como se puede observar en la **Figura R12**, panel A, las células SHSY5Y transducidas y tratadas con doxyciclina expresaban tRFP. Además, las células transducidas con el lentivirus L-Trip-iStau1 presentaban una disminución en la expresión de hStaufen1 de las dos bandas correspondientes a las diferentes isoformas de la proteína sólo cuando fueron tratadas con doxyciclina (**Figura R13**, panel B). Para determinar si la expresión de la tRFP correlacionaba inversamente al nivel de expresión de hStaufen1 se analizaron por inmunofluorescencia las células SHSY5Y transducidas con L-Trip-iStau1 o con L-Trip y se trataron durante 72 horas con doxyciclina.

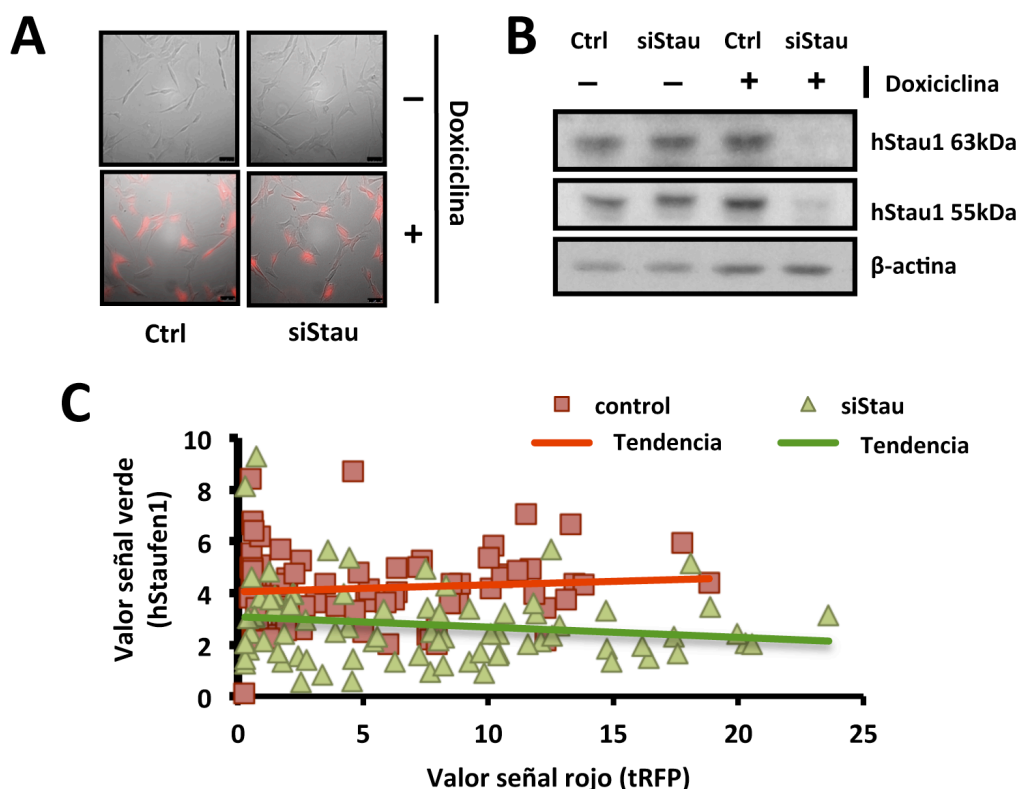


Figura R12: Silenciamiento de las líneas celulares SHSY5Y transducidas con el lentivirus L-TRIP y L-Trip-iStau. Se sembraron células SHSY5Y y se transdujeron con los lentivirus L-Trip o L-Trip-iStau1. Se seleccionaron con puromicina y se trataron (+) o no (-) con doxiciclina durante 72h. **(A)** Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para observar la expresión de la tRFP. **(B)** Se obtuvieron los extractos celulares y se realizó un *Western blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas β -actina y hStaufen1. **(C)** Se fijaron células tratadas del mismo modo que los paneles anteriores y se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para hStaufen1 y el anticuerpo secundario con el fluoróforo Alexa-488. La gráfica muestra el valor de la señal del canal rojo a 594nm (señal correspondiente a la expresión de tRFP) y del canal verde a 488nm (señal correspondiente al anticuerpo secundario Alexa-488) por célula de 80 células en total.

La gráfica del panel C de la **Figura R12** muestra la cuantificación de la señal de fluorescencia a 488 nm (verde), emitida por el anticuerpo secundario que revela la señal correspondiente a hStaufen1 y a 594nm (rojo), emitida por la tRFP para cada célula. Se analizaron un total de 80 células seleccionadas aleatoriamente. Como se puede observar, las células transducidas con L-Trip-iStau1 presentaban valores de señal de hStaufen1 (verde) menores que las células control, aunque la disminución de la señal no se correlacionaba con el nivel de señal tRFP (rojo). Por lo tanto pudimos concluir que el nivel de silenciamiento de las células SHSY5Y transducidas e inducidas con doxiciclina es independiente de los niveles la expresión de tRFP.

Para caracterizar más a fondo el silenciamiento inducible por doxiciclina en las células generadas se decidió analizar el tiempo de recuperación de la expresión de hStaufen1 una vez se retiraba la doxiciclina del medio. Para ello se trataron las células con doxiciclina durante 72h hasta obtener la máxima disminución de la expresión de hStaufen1. A ese tiempo se eliminó la

doxiciclina del medio, aún manteniendo la puromicina (para mantener la selección) y se obtuvieron extractos celulares a las 0h, 24h, 48h, 72h y 96h. La expresión de hStaufen1 se analizó mediante *Western Blot*, usando la proteína β -actina como normalizador de la cantidad de proteína. Tal y como se puede observar en la **Figura R13** la recuperación de los niveles basales de expresión de hStaufen1 se produjo a las 96h aunque a ese tiempo aún se pudo observar la presencia de la tRFP intracelular (datos no mostrados).

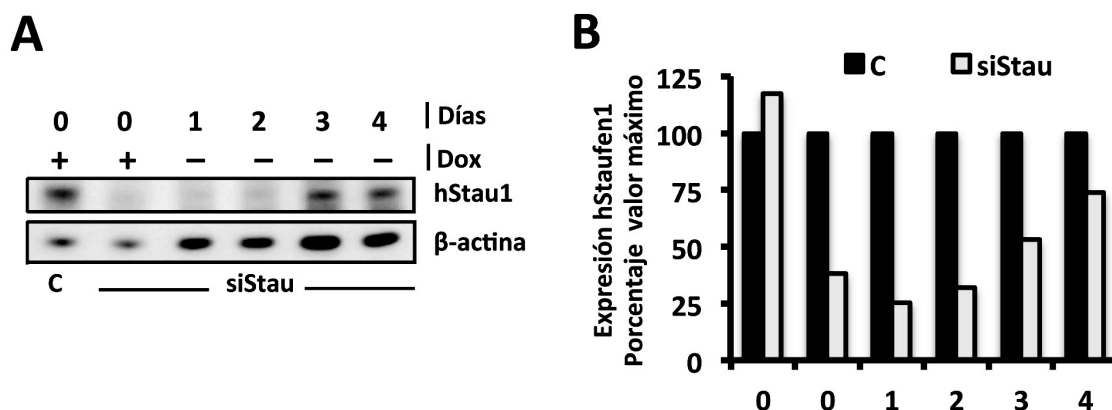


Figura R13: Recuperación de la expresión de hStaufen1 después del tratamiento con doxiciclina. (A) Se trataron células SHSY5Y transducidas con los lentivirus L-Trip (Ctrl) o L-Trip-iStau1 (siStau) con (+) o sin (-) doxiciclina durante 72 horas (Tiempo 0). Se retiró la doxiciclina y se obtuvieron los extractos celulares hasta 96 horas posteriores al cambio de medio y se analizaron por Western Blot con anticuerpos específicos. (B) Se cuantificó por densitometría las bandas correspondientes a hStaufen1 y β -actina. La gráfica representa el porcentaje del valor de la expresión de hStaufen1 con respecto al control, usando el valor de la señal de β -actina como control de carga.

2.2 Análisis fenotípico celular

Antes de analizar el papel de hStaufen1 durante la diferenciación neuronal fue necesario estudiar si el silenciamiento de la proteína tenía algún efecto general en el fenotipo de las células de neuroblastoma transducidas. Por ello se determinaron la tasa de crecimiento celular y la eficiencia de la diferenciación a un fenotipo de células neuronales.

2.2.1 Tasa de crecimiento celular

Para el análisis de la tasa de crecimiento celular se trataron las líneas celulares SHSY5Y transducidas con L-Trip o con L-Trip-iStau1 con doxiciclina durante 72h, tiempo suficiente para disminuir los niveles de expresión de hStaufen1 al máximo. En ese momento se sembraron 10^5 células en placa. A los 2 y 4 días se contaron las células de cada muestra y se calculó la tasa de crecimiento celular con respecto al número de células iniciales. El panel A de la **Figura R14** muestra que no hay diferencias significativas en la tasa de crecimiento celular de las células

silenciadas con respecto al control negativo. Estos datos muestran que la disminución de la expresión de hStaufen1 no afecta al crecimiento celular en las líneas de neuroblastoma humano transducidas.

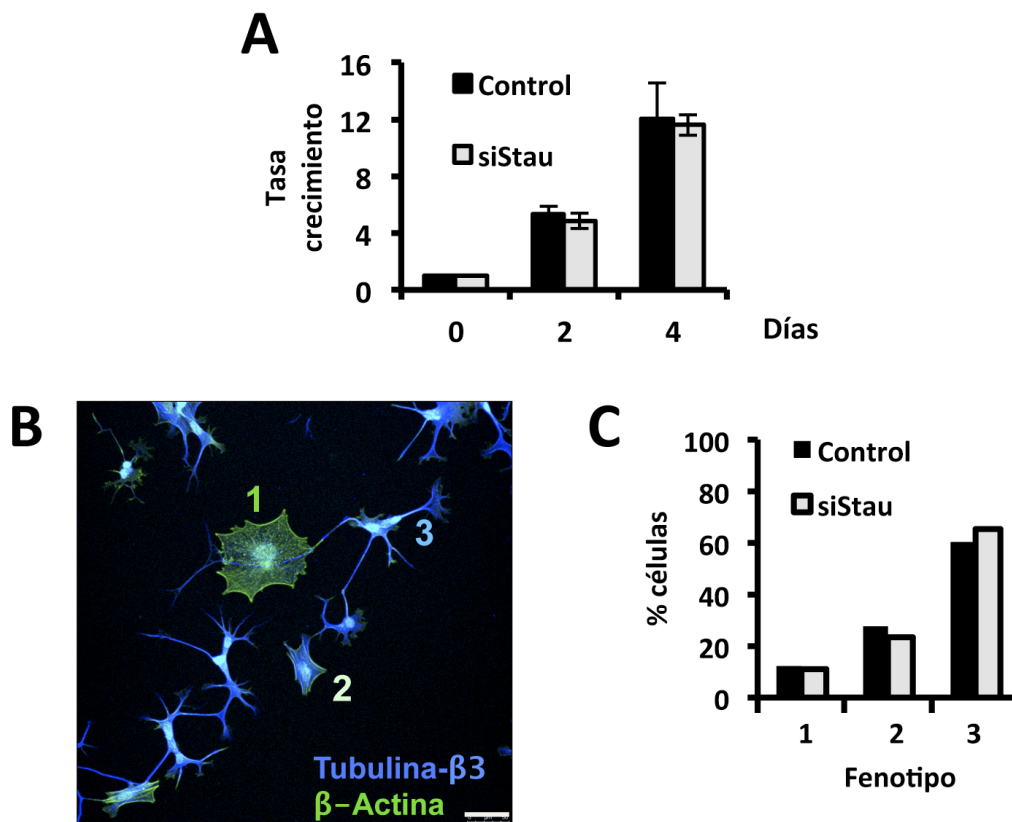


Figura R14: Análisis de la viabilidad de las células SHSY5Y transducidas y tratadas con doxiciclina. (A) Se sembraron 20000 células de cada muestra previamente tratadas con doxiciclina y se determinó la tasa de crecimiento de los días 2 y 4 dividiendo el número de células de cada día por el número de células iniciales. **(B)** Se fijaron las células a día 7 de diferenciación y se realizó una inmunofluorescencia para detectar las proteínas Tubulina- β3 (azul) y los filamentos de actina utilizando un anticuerpo específico y la Faloidina (verde) respectivamente. **(C)** Se examinaron aleatoriamente 100 células de cada muestra y se clasificaron en 3 fenotipos diferentes: fibroblasto (1), intermedia (2) y neuronas (3). La gráfica muestra el porcentaje de células de cada muestra en cada fenotipo.

2.2.2 Análisis de los fenotipos celulares durante la cinética de diferenciación *in vitro*

Al realizar una inmunofluorescencia de las células SHSY5Y diferenciadas utilizando un anticuerpo frente a la tubulina-β3 (específica de neuronas) y una tinción con faloidina unida al fluoróforo Alexa-488 para detectar los filamentos de actina, se observaron diferentes fenotipos. La diferenciación de las células de neuroblastoma humano a un fenotipo neuronal no ocurre en el 100% de las células en cultivo. Se decidió clasificar los fenotipos resultantes de la diferenciación en 3 clases: 1-fenotipo fibroblasto, 2-fenotipo intermedio y 3-fenotipo neurona. El fenotipo fibroblasto no presenta prolongación dendrítica alguna. El haz de

filamentos de actina está perfectamente polimerizado en toda la superficie de la célula y la expresión de tubulina- $\beta 3$ se presenta en unos niveles muy bajos o indetectables. El fenotipo neurona presenta prolongaciones y ramificaciones típicas de células neuronales. Los filamentos de actina se sitúan en los conos de crecimiento de las dendritas y la expresión de tubulina- $\beta 3$ presenta unos niveles altos a lo largo de toda la célula. El fenotipo intermedio presentaba características de los dos anteriores. En el panel B de la **Figura R14** se muestran células representativas de cada clase fenotípica. Para analizar si el silenciamiento del gen que codifica hStaufen1 afectaba a la eficacia de la diferenciación de las líneas SHSY5Y transducidas se clasificaron 100 células tomadas aleatoriamente a partir de cultivos silenciados por tratamiento con doxiciclina o no silenciados. El panel C de la **Figura R14** muestra que no se observó una variación significativa en el porcentaje de células de cada clase en las células silenciadas con respecto al control negativo.

2.2.3 Análisis dendrítico de las células de neuroblastoma silenciadas

Para analizar la relevancia de hStaufen1 durante la diferenciación neuronal se utilizaron las líneas SHSY5Y transducidas con L-Trip y L-Trip-iStau1. Se trató el cultivo con el antibiótico doxiciclina durante 72 horas hasta reducir los niveles de hStaufen1 celular y se indujo la primera fase de la diferenciación del cultivo con ácido retinoico. A los 5 días se cambió el medio por Neurobasal con los factores celulares BDNF y dbAMPc manteniendo durante toda la diferenciación en el medio doxiciclina y puomicina (ver esquema del proceso en la **Figura R15**). Se fijaron las células con paraformaldehído al séptimo día de inducir la diferenciación. Los cultivos se analizaron por fluorescencia usando un anticuerpo que reconoce la proteína tubulina- $\beta 3$, faloidina acoplada al fluoróforo Alexa-488 para poder detectar los filamentos de actina y DAPI para marcar el DNA y por lo tanto poder identificar el núcleo. En el canal de longitud de onda de 594nm se observó la señal correspondiente a la expresión de la tRFP. Se tomaron imágenes de microscopia confocal de toda la muestra de manera automática utilizando la función TileScan del microscopio y se analizaron 50 células por muestra. A modo de ejemplo, en el panel A de la **Figura R16** se muestran células del cultivo celular diferenciado de cada muestra. La cuantificación de la longitud dendrítica, determinada utilizando el software de análisis ImageJ, mostró que las células donde la expresión de hStaufen1 estaba silenciada presentaban una disminución en la suma de la longitud dendrítica total con respecto a las células control (panel B, **Figura R16**).

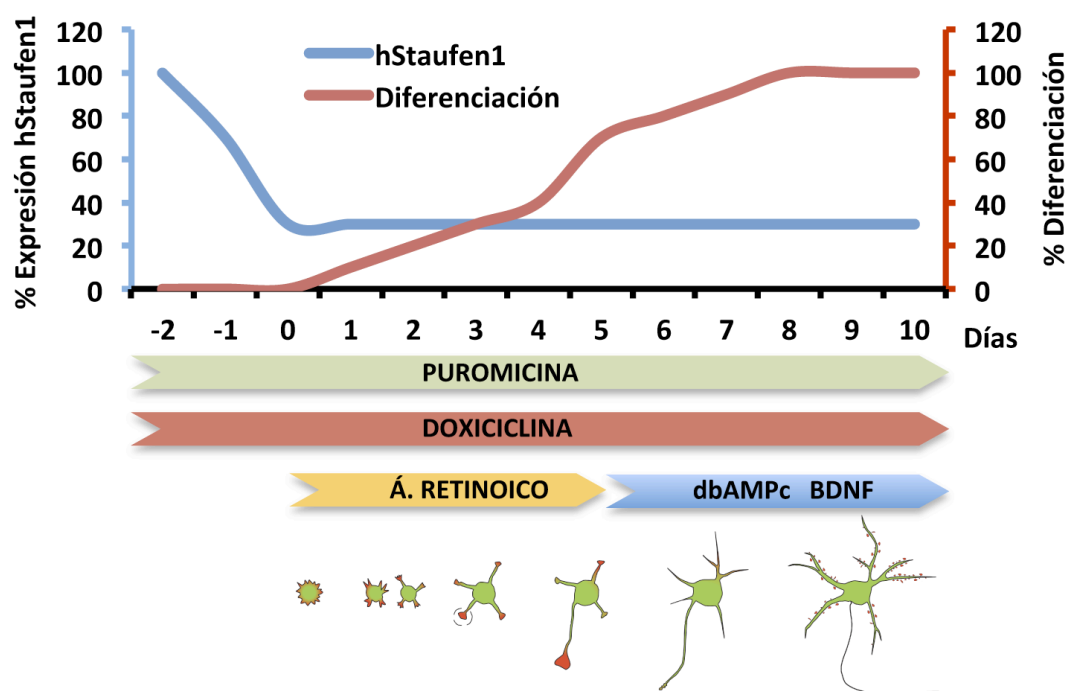


Figura R15: Representación de la cinética de silenciamiento del gen de hStaufen1 y diferenciación de las células SHSY5Y transducidas con L-TRIP-iStau1. En rojo se representa el esquema de la cinética de diferenciación. En azul se representa el esquema de la expresión de hStaufen1. En el eje de abscisas se muestra los días de diferenciación y se indican los compuestos añadidos al medio para el silenciamiento de la proteína (doxiciclina), diferenciación (ácido retinoico, dbAMPc y BDNF) y selección celular (puromicina) y una representación de la diferenciación neuronal (adaptado de Govek et al., 2005).

Los ratones transgénicos *Stau1(tm1Apa)* presentan una disminución en el número de ramificaciones dendríticas en células neuronales a partir del orden dendrítico secundario (Vessey et al, 2008). Se analizó si en células de neuroblastoma humano silenciadas en la proteína hStaufen1 se producía un efecto similar. Tal y como se puede observar en el panel C de la **Figura R16**, la suma de la longitud total de las dendritas primarias no presenta diferencias entre las células control y las células silenciadas. En cambio, a partir del orden dendrítico secundario se observa una disminución de la suma de la longitud en las células silenciadas para hStaufen1. Además, esta disminución es mayor a medida que la complejidad dendrítica aumenta, siendo las dendritas más afectadas las cuaternarias. Esta disminución podría deberse a una reducción de la longitud de cada dendrita o bien a una reducción del número de dendritas.

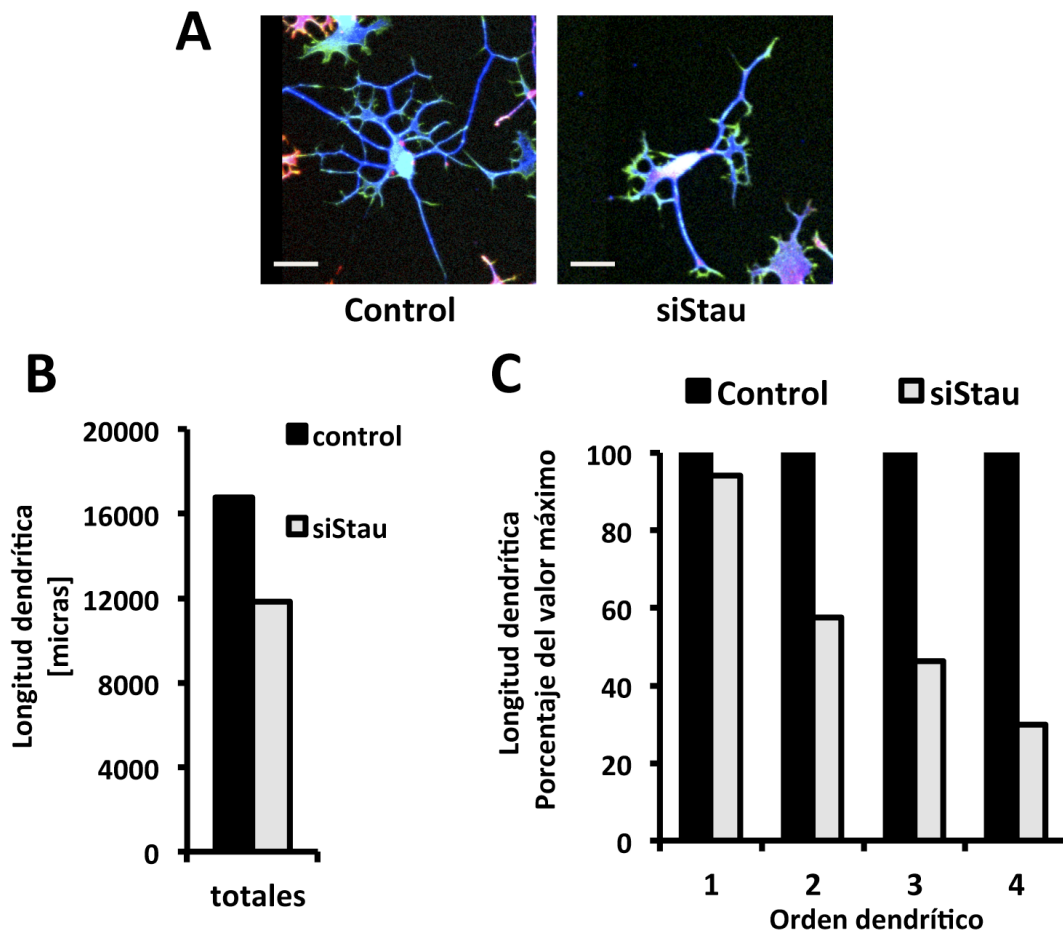


Figura R16: Análisis de la longitud dendrítica de células SHSY5Y con el gen de hStaufen1 silenciado. Se diferenciaron células SHSY5Y tratadas previamente con doxiciclina durante 72h añadiendo al medio ácido retinoico a día 0 y BDNF y AMPc a día 5. El día 7 post-inducción se fijaron las células y se llevó a cabo una inmunofluorescencia para detectar las proteínas tubulina β 3 (Alexa 647, azul) y los filamentos de actina (faloidina-Alexa-488, verde). Se tomaron imágenes de toda la muestra con un barrido de imágenes de manera automática. **(A)** Imágenes representativas de las células control y silenciadas (siStau). Se analizaron aleatoriamente 50 células de cada muestra y se determinó la longitud dendrítica. **(B)** Representación gráfica de la longitud dendrítica total de cada muestra. **(C)** Representación gráfica del porcentaje del valor máximo de la longitud dendrítica según el orden dendrítico de cada muestra. La barra de escala corresponde a 25 μ m.

Para discernir entre estas posibilidades se calculó en primer lugar la longitud media por orden dendrítico. Como se puede observar en la **Figura R17**, panel A, la media de la longitud por dendrita no presenta cambios significativos en ninguno de los ordenes dendríticos. Sin embargo, el número de dendritas si presenta diferencias significativas entre las células silenciadas y las células control (panel B, **Figura R17**) a partir del orden dendrítico 2 con un $p\text{-value} \leq 0,05$. Por lo tanto, estos datos muestran que el silenciamiento de hStaufen1 provoca la disminución del número de dendritas a partir del orden dendrítico secundario aunque la longitud por dendrita no se ve afectada.

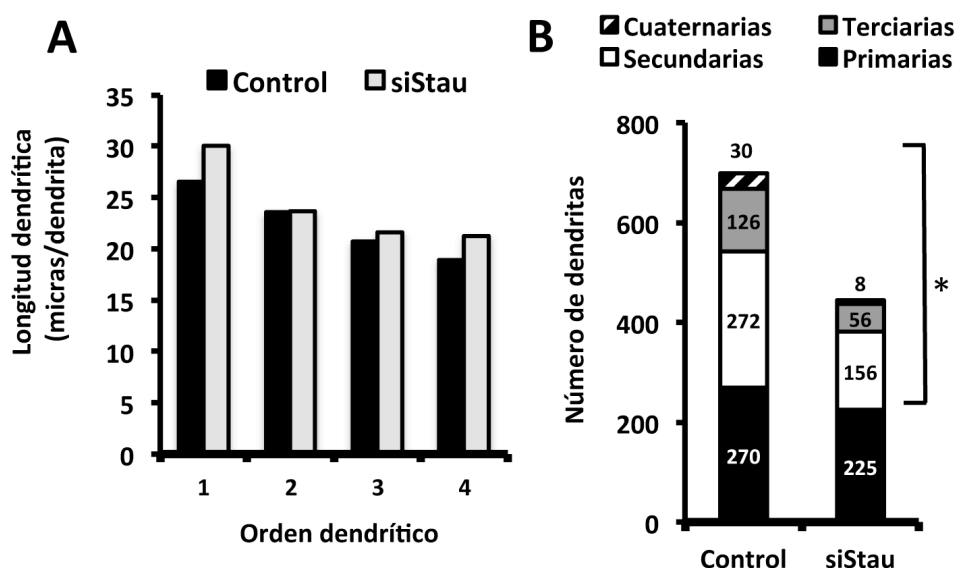


Figura R17: Análisis de la longitud y el número de dendritas de cada orden. (A) Representación gráfica de la media de la longitud por dendrita de cada muestra y orden dendrítico. **(B)** Cuantificación del número de dendritas según el orden dendrítico por muestra (* p-value $\leq 0,05$).

3- IMPLICACIÓN DE hSTAUFEN1 EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

Se han realizados estudios en los que se muestra la interacción de hStaufen1 con proteínas del virus de la gripe (de Lucas et al, 2010; Falcón et al, 1999; Lee et al, 2011). Estos estudios describen la interacción de hStaufen1 con la proteína NS1 del virus de la gripe tanto *in vitro* en un ensayo de doble híbrido como *in vivo* colocalizando en los polisomas celulares. Además, se describió no sólo la interacción con NS1, sino que durante la infección se produce una interacción de los complejos de hStaufen1-TAP tanto con las RNPs del virus como con los mRNAs virales, que se incorporan en los complejos de Staufen1-TAP de forma similar a los mRNAs celulares. Todos estos estudios sugerían que hStaufen1 podría tener una implicación durante el ciclo de infección por el virus de la gripe y por ello durante el desarrollo de esta Tesis se analizó esta hipótesis.

3.1 Análisis de la interacción de los complejos hStaufen1 con RNPs reconstituidas del virus de la gripe

Para profundizar en el estudio de la interacción de hStaufen1 con las RNPs del virus de la gripe y corroborar los datos obtenidos en células infectadas se procedió a analizar dicha interacción en sistemas recombinantes. Para ello se llevó a cabo una reconstitución de RNPs por

transfección de células HEK293T con los plásmidos necesarios para generar RNPs activas del virus de la gripe, pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA, pCMV-NP y pHHNS1, así como con los plásmidos pChStaufen1-TAP o pCTAP como control negativo. Se obtuvieron los extractos citoplasmáticos y se realizó una purificación de las muestras mediante cromatografía de afinidad usando la etiqueta TAP. Se analizó por *Western Blot* el extracto inicial, el material que no se unió a IgG y el material eluido de la resina de IgG después del tratamiento con la proteasa TEV. En el panel A de la **Figura R18** se puede observar en el eluido de la purificación la presencia de las proteínas de las RNPs PA y NP así como la proteína NS1. No se observó la presencia de ninguna de las proteínas anteriores en los eluidos de la muestra TAP. Por otra parte, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos que codifican el trómero de la polimerasa junto con el plásmido pChStaufen1-TAP o bien con el plásmido pCTAP como control. Los extractos celulares se usaron para purificar el complejo según el protocolo TAP, tal y como se ha descrito antes y los eluidos se analizaron por *Western blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas PA, PB1 o PB2. Tal y como observamos en el panel B de la **Figura R18** las tres proteínas de la polimerasa se detectaron asociadas a hStaufen1 pero no en la muestra TAP. Estos resultados indican que hStaufen1 interacciona con el trómero de la polimerasa viral.

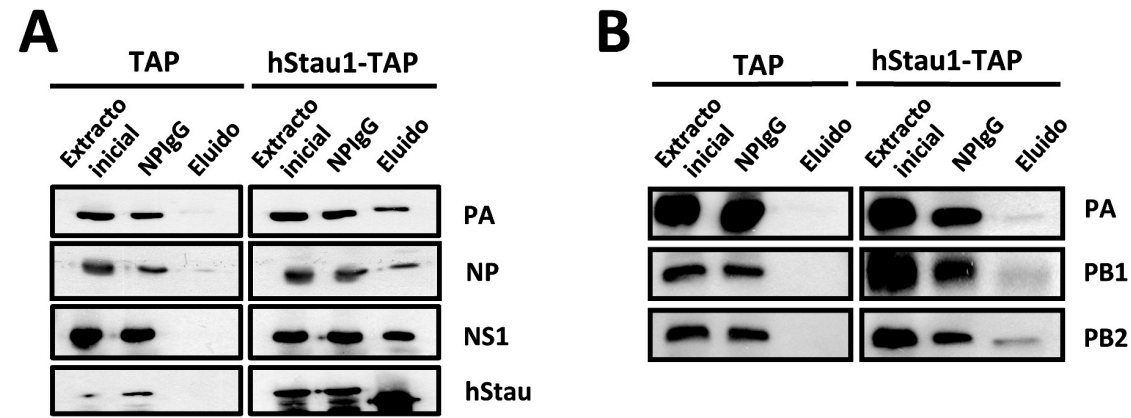


Figura R18: Interacción de las RNPs y la polimerasa del virus de la gripe con los complejos de hStaufen1-TAP. (A) Se cotransfectaron células HEK293T con cada elemento de las RNPs del virus de la gripe utilizando los plásmidos pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA, pCMV-NP y pHH-NS1 con los plásmidos pCTAP o pChStaufenTAP. Se realizó una purificación mediante la etiqueta TAP y los eluidos se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas NP, PA y hStaufen1. (B) Se cotransfectaron células HEK293T con los plásmidos que expresan cada elemento de la polimerasa viral con pCTAP o pChStaufen1TAP y se analizaron los eluidos de la purificación por TAP mediante *Western Blot*. Los carriles muestran el extracto inicial, el extracto no pegado a la resina de IgG (NP1gG) y el eluido de la resina de Calmodulina después del tratamiento con la proteasa TEV (Eluido).

3.2 Interacción de hStaufen1-TAP con cada elemento de la RNP

Para estudiar más en detalle la asociación de los complejos de hStaufen1 con la RNP del virus de la gripe se decidió analizar cual(es) de sus elemento(s) interaccionaban de manera individual con los complejos de hStaufen1. Para ello se transfectaron células HEK293T con cada uno de los plásmidos que codifican las proteínas PA, PB1, PB2 o NP con el plásmido que codifica hStaufen1-TAP o bien la etiqueta TAP como control. Se realizó la purificación según el protocolo TAP y se analizaron los eluidos de la resina de IgG mediante *Western blot* con anticuerpos específicos. El panel A de la **Figura R19** muestra la presencia de la proteína NP en los eluidos que contienen hStaufen1 pero no en el control, mientras que las proteínas PA, PB1 o PB2 no fueron detectables. Estos resultados indican que los complejos de hStaufen1 son capaces de interaccionar con la proteína viral NP pero no con cada elemento de la polimerasa viral por separado, necesitando la formación previa del complejo de la polimerasa para interaccionar con hStaufen1 como se ha mostrado en la **Figura R18B**.

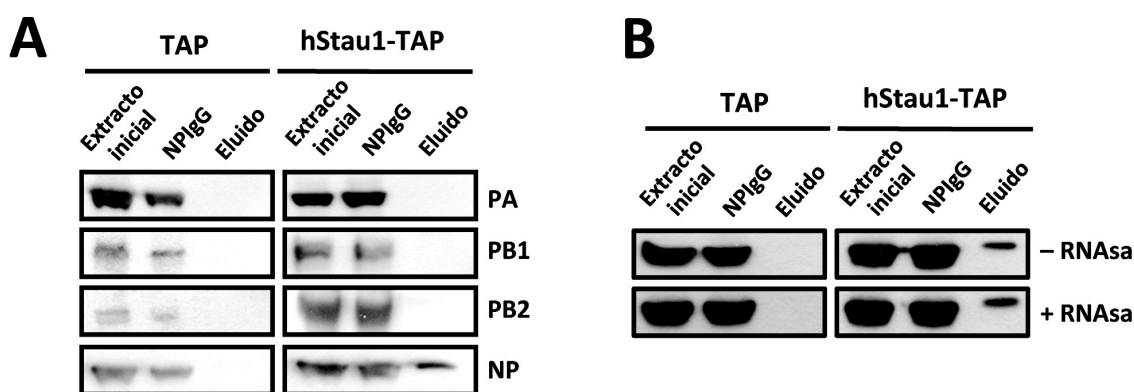


Figura R19: Interacción de los elementos de la RNP del virus de la gripe con los complejos de hStaufen1-TAP. (A) Se co-transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCMV-PB1 o pCMV-PB2 o pCMV-PA o pCMV-NP con los plásmidos pCTAP o pChStaufenTAP. Se realizó una purificación mediante la etiqueta TAP y se analizó el extracto inicial, el no pegado a IgG (NPiG) y el eluido mediante *Western Blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas NP, PA, PB1, PB2 y hStaufen1. (B) Se trataron extractos iniciales celulares obtenidos de células co-transfectadas con los plásmidos que expresan NP y hStaufen1 o TAP con (+RNasa) o sin (-RNasa) RNasa A. Se realizó la purificación por la etiqueta TAP y el extracto inicial, el NPiG y el eluido se analizó mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos.

Dado que la proteína NP une RNA con una alta afinidad, se decidió analizar si la unión de NP con el complejo de hStaufen1 era vía RNA. Para ello se transfectaron células HEK293T con los plásmidos pCMV-NP y pChStaufen-TAP o pCTAP, los extractos celulares se trataron con RNasa A y se realizó la purificación por la etiqueta TAP según se ha descrito anteriormente. Tal y como se muestra en el panel B de la **Figura R19** se observó la presencia de la proteína NP en los eluidos de la purificación tanto en los extractos tratados como los no tratados por la RNasa

A. Por lo tanto se puede concluir que la proteína NP interacciona de manera individual con los complejos de hStaufen1 y que esa unión no se debe a una simple asociación de ambas proteínas al mismo RNA.

3.3 La proteína hStaufen1 participa en la correcta formación de viriones de gripe

hStaufen1 interacciona con las RNPs del virus de la gripe durante la infección y colocaliza con los elementos de las vRNPs en estadíos tempranos de la infección y con la proteína no estructural NS1 (de Lucas et al, 2010). Además tal y como se ha mostrado los complejos de hStaufen1-TAP interaccionan con las RNPs recombinantes, con el trímero de la polimerasa y con NP en células transfectadas. Estos datos sugieren que hStaufen1 podría tener un papel durante la formación de nuevos viriones. Para estudiar esta hipótesis se decidió analizar la formación de partículas virales en células epiteliales de carcinoma de pulmón (A549) en las que la expresión de hStaufen1 había sido reprimida por silenciamiento génico con RNAs interferentes (siRNAs). Para ello se transfectaron células A549 con cada uno de los 3 siRNAs que hibridan con el mRNA de hStaufen1 (S1, S2, S3, **apartado 2.8.1** Materiales y Métodos) o bien con una secuencia irrelevante como control negativo (C). El silenciamiento génico se verificó mediante *Western Blot* de extractos celulares con anticuerpos específicos para la proteína hStaufen1 utilizando la proteína β -actina como control de carga. Tal y como se muestra en la parte superior del panel A de la **Figura R20**, los 3 silenciadores fueron capaces de reducir la expresión de hStaufen1 siendo el silenciador S2 el que conseguía una disminución mayor, tanto de la banda que corresponde a la isoforma de 63 kDa como de la banda de 55 kDa. Una vez verificado el silenciamiento de la proteína, se realizó una cinética de infección en células A549 silenciadas a una MDI de 10^{-3} UFP/célula con la cepa WSN del virus de la gripe. Se obtuvieron los sobrenadantes del cultivo a 0h, 24h, 48h y 60h y se llevó a cabo una titulación mediante ensayo en placa en células MDCK. Los resultados mostraron que las células silenciadas presentaban una reducción del título viral respecto a las células control (**Figura R20A**, panel inferior). Las células transfectadas con el siRNA S2, cuya reducción de la expresión de hStaufen1 es mayor, presentaban una disminución del título viral de aproximadamente 1,5 logaritmos. Las células transfectadas con los siRNAs S1 y S3 presentaban una disminución menor del título. En los tres casos la disminución del título estaba en consonancia con el nivel de expresión de hStaufen1. Para analizar si el efecto en el título viral era específico del virus de la gripe y no una alteración general de la célula al disminuir la expresión de hStaufen1, se realizó una cinética de infección en células silenciadas utilizando el virus de la estomatitis vesicular (VSV) para la infección. Se transfectaron células A549 con cada uno de los tres siRNAs, así como con un siRNA irrelevante y se procedió a la infección de los cultivos con VSV a

una MDI de 10^{-3} UPF/célula. Se obtuvieron los sobrenadantes a las 0h, 6h, 12h, 24h, 36h, y 48h y se determinó el título. Tal y como se puede observar en el panel B de la **Figura R20** las células silenciadas no presentaban una disminución significativa en el título viral. Por lo tanto la disminución en la expresión de hStaufen1 reduce de manera específica el título en infecciones por el virus de la gripe.

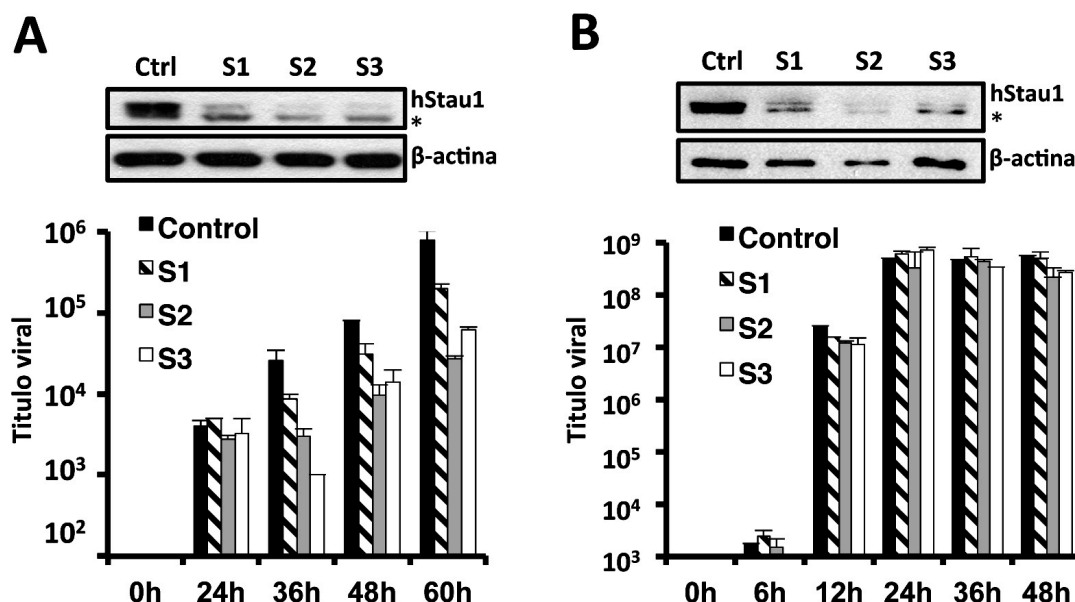


Figura R20: Título del virus de la gripe y de VSV en células A549 silenciadas en el gen de hStaufen1. Se transfectaron células A549 con los RNAs interferentes Ctrl, S1, S2 y S3. El nivel de expresión de hStaufen1 se determinó mediante el análisis de extractos celulares por *Western Blot* usando la β -actina como control de carga en ambos paneles. * indica una banda de reacción cruzada del anticuerpo. **(A)** Las células se infectaron a una MDI de 10^{-3} UPF/célula con la cepa WSN del virus de la gripe y se tituló el sobrenadante a tiempos 0h, 24h, 36h, 48h, y 60h mediante titulación en placa en células MDCK. **(B)** Las células se infectaron a una MDI de 10^{-3} UPF/célula con el virus VSV y el título se determinó con una titulación en placa en células MDCK del sobrenadante a tiempos 0h, 6h, 12h, 24h, 36h, y 48h.

Para analizar si la disminución del título viral era consecuencia de la reducción de la infectividad de las partículas o bien del número de partículas producidas se infectaron cultivos de células silenciadas o control, se obtuvieron los extractos celulares y se purificaron los viriones de los sobrenadantes. Ambos tipos de muestras se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos que reconocen las proteínas NP y M. Tal y como se puede observar en el panel A de la **Figura R21** la acumulación de viriones procedentes de células silenciadas (S1, S2, y S3) fue menor que en la muestra control (C). Por el contrario, los extractos celulares no presentaron una reducción comparable de NP, usando β -actina como control de carga (**Figura R21B**). Por lo tanto podemos concluir que la proteína hStaufen1 es importante para la correcta formación de viriones del virus de la gripe y que los datos sugieren que la infectividad de dichos viriones no está afectada aunque sí el rendimiento de la infección.



Figura R21: Producción de partículas virales en células silenciadas. Se transfectaron cultivos de células A549 con 3 siRNA específicos para el gen de hStaufen1 (S1, S2 y S3) o un siRNA irrelevante (Ctrl) como control. Se infectaron los cultivos a una MDI de 10^{-3} UPF/célula con la cepa del virus de la gripe WSN. **(A)** Se obtuvo el sobrenadante de las células infectadas a las 60h, se purificaron las partículas virales mediante gradiente de sacarosa y se analizaron por *Western Blot* con anticuerpos específicos que reconocen las proteínas NP y M del virus de la gripe para cada muestra. **(B)** Se obtuvieron los extractos celulares de las células infectadas y se analizaron por *Western Blot*. Se utilizó la proteína β-actina como control de carga. Las muestras corresponden al control negativo (Ctrl), la mitad de carga del control negativo (Ctrl/2) y los tres silenciadores de la proteína hStaufen1 (S1, S2, S3).

3.4 Relocalización de hStaufen1 durante la infección por gripe

El silenciamiento de hStaufen1 provoca una reducción de más de diez veces del título viral en células epiteliales de pulmón y por otro lado, hStaufen1 es capaz de interactuar con las RNPs del virus. Además, el análisis de viriones purificados mostró que no había un defecto evidente en la incorporación de alguna vRNP específica dentro del virión (de Lucas et al, 2010). Ya que hStaufen1 participa en el transporte de mRNAs intracelulares a través del citoesqueleto, se planteó la hipótesis de que hStaufen1 podría tener un papel en el transporte de las vRNPs virales hasta la membrana plasmática. Para analizar la distribución de hStaufen1 en fases tardías de la infección se sembraron células A549, se infectaron con la cepa WSN a alta MDI (5 UPF/célula) y se fijaron a 0, 6 y 9 h.p.i. Se llevó a cabo una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo que reconoce hStaufen1 y se obtuvieron las imágenes utilizando un microscopio confocal. La **Figura R22** muestra como hStaufen1 se acumula en una zona perinuclear de la célula a 9 h.p.i.

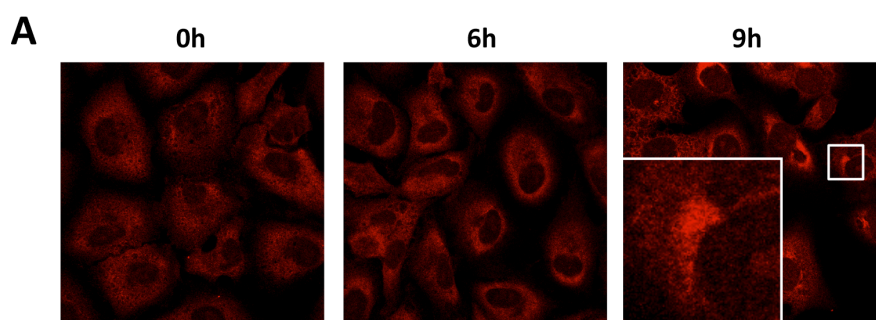


Figura R22: Relocalización de hStaufen1 durante la infección por el virus de la gripe en etapas tardías de la infección. Se infectaron células A549 a alta MDI (5 UFP/célula) y se fijaron con formaldehído a las 9 h.p.i. Se realizó una inmunofluorescencia para detectar la proteína hStaufen1 (rojo) con el anticuerpo específico. Se tomaron imágenes con un microscopio confocal.

Para identificar si las vRNPs del virus se relocalizaban en la misma zona se realizó un ensayo de hibridación *in situ* (FISH) con ribosondas marcadas con digoxigenina que hibridan específicamente con el vRNA del virus en células A549 infectadas y fijadas a 9 h.p.i. Como consecuencia del tratamiento con proteinasa K que incluye este protocolo, no se pudo detectar la proteína hStaufen1 a causa, probablemente, de la pérdida de los epítomos reconocidos por el anticuerpo. La **Figura R23** muestra como del mismo modo, las vRNP del virus se agrupan en una zona perinuclear muy similar a las estructuras observadas con la proteína hStaufen1 durante la infección sugiriendo que tanto vRNPs como hStaufen1 colocalizan en una zona perinuclear a las 9 horas post-infección.

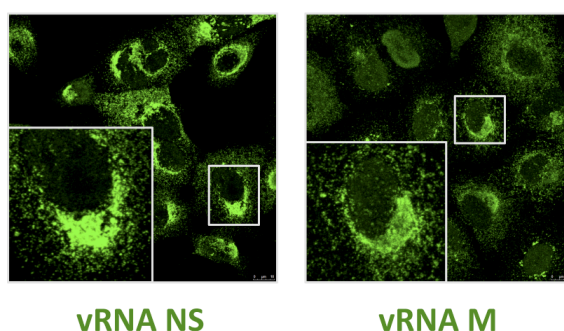


Figura R23: Relocalización de las vRNPs del virus de la gripe en etapas tardías de la infección. Se sembraron células A549, se infectaron a alta MDI (5 UFP/célula) y se fijaron con formaldehído a las 9 h.p.i. Se marcaron sondas que hibridan con el vRNA del segmento NS y M del virus con digoxigenina y se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce específicamente la digoxigenina (verde).

Para determinar el compartimento celular perinuclear en el que hStaufen1 se relocalizaba durante la infección, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de células A549 infectadas con WSN a alta MDI (5 UPF/célula) y se fijaron a 9 h.p.i. Se utilizó el anticuerpo que reconoce la

proteína hStaufen1 en paralelo con diferentes reactivos: el anticuerpo que reconocen la β -tubulina, el marcador del centro organizador de microtúbulos (MTOC) γ -tubulina, el marcador de aparato de Golgi (AG) WGA, el marcador de compartimentos intermedios (CE) ERGIC, o el marcador de retículo endoplásmico (RE) PDI. Tal y como muestra la **Figura R24A**, hStaufen1 no colocaliza ni con el MTOC, ni con el aparato de Golgi ni con los compartimentos intermedios, aunque se sitúa en zonas muy próximas o rodeando a estos compartimentos. Por otro lado hStaufen1 si colocaliza con el RE tanto en células infectadas como en células no infectadas (**Figura R24B**) tal y como ya se caracterizó previamente (Marión et al, 1999, Wickham, 1999). Los datos obtenidos sugieren que esta área de relocalización de la proteína hStaufen1 durante la infección corresponde a una zona celular citoplasmática con alto tráfico vesicular.

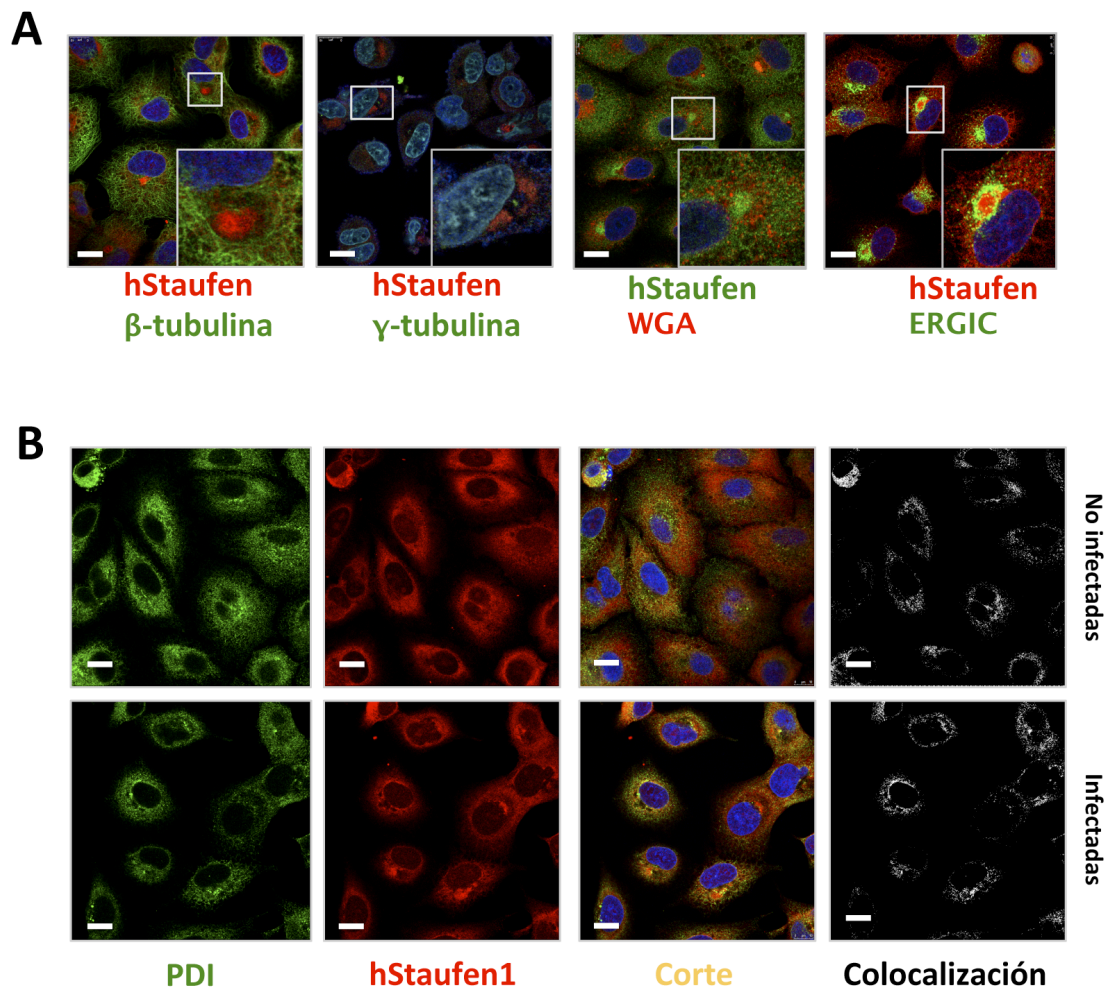


Figura R24: Análisis del compartimento celular donde relocaliza hStaufen durante la infección. Se sembraron células A549, se infectaron a alta MDI (5 UFP/célula) y se fijaron con formaldehído a las 9 h.p.i. y se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos específicos para determinar **(A)** la localización de hStaufen1 (rojo) y alfa-tubulina (verde), hStaufen1 (rojo) y gamma-tubulina (verde), hStaufen1 (verde) y WGA, hStaufen1 (rojo) y ERGIC (verde) o **(B)** hStaufen1 (rojo) y PDI (verde) y se analizó su colocalización en células infectadas y no infectadas. La barra de escala corresponde a 25 μ m.

Discusión

1- CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE hSTAUFEN1 EN LA CÉLULA

La proteína Staufen forma parte de complejos ribonucleoproteicos de gran tamaño llamados gránulos de RNA que tienen un papel fundamental en el transporte de mRNAs y la traducción localizada (Kanai et al, 2004; Mallardo et al, 2003; Tang et al, 2001; Villacé et al, 2004). En estos gránulos son componentes fundamentales proteínas que regulan la traducción, como FMRP y PABP y proteínas ribosomales; proteínas del citoesqueleto y motoras como la dineína y la kinesina. Se ha propuesto que la regulación de los mRNAs en estos complejos tendría como objetivo limitar su traducción en localizaciones específicas de la célula. En este sentido, se podría especular que la inhibición de la represión de los mRNA se deba a interacciones con la maquinaria de silenciamiento y represión de la traducción mediada por el RISC. Dado que en neuronas motoras de *D. melanogaster* se ha observado que los gránulos neuronales de Stau1 contienen proteínas de los P-bodies como Dcp1p y Xrn1p/Pacman, Ago2 y represores de traducción como Me31B (Barbee et al, 2006) en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se propuso analizar si existía esta relación también en células humanas.

1.1 La proteína hStaufen1 forma parte de complejos de represión de la traducción mediada por miRNAs.

Aunque se conocen muchos de los componentes de los gránulos de transporte de hStaufen1, previamente no se habían detectado en ellos proteínas que participan en la represión de la traducción mediada por miRNAs (complejo del RISC) y proteínas de *P-bodies*. Los resultados obtenidos muestran que se produce una interacción de hStaufen1 con proteínas de la familia AGO como son Ago1, Ago2 y Ago3 (**Figura R1A**). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que si bien existe una interacción de cada una de estas proteínas con los complejos de hStaufen1 al sobre-expresarlas, tan sólo una pequeña fracción de Ago2 endógena interacciona con hStaufen1, ya que sólo fue posible detectarla realizando el primer paso de purificación del protocolo TAP y no se observó una colocalización significativa en el citoplasma de ambas proteínas (**Figura R2**). Además, en células de neuroblastoma humano, sólo una pequeña fracción de Ago2 y RCK/p54 migran en las mismas fracciones que los complejos hStaufen1 (**Figura R6A**). Este conjunto de datos no descarta que, de igual modo, una pequeña fracción de la proteína RCK/p54 se asocie a los complejos de hStaufen1 aunque quizás no se haya podido detectar ni su interacción ni su colocalización por falta de sensibilidad. Teniendo en cuenta que Ago2 se une directamente a miRNAs (Dueck et al, 2012; Tan et al, 2009) podemos sugerir que al menos una parte de los complejos donde participa hStaufen1 contienen mRNAs que podrían viajar reprimidos por la maquinaria RISC.

1.2 Mecanismo de unión de mRNAs al complejo de hStaufen1.

Staufen1 se caracterizó en los años 90 como una proteína necesaria para el correcto desarrollo embrionario en *D. melanogaster*, dónde es responsable de la localización de RNAs maternos en polos específicos del embrión (St Johnston et al, 1991). Los primeros datos obtenidos de su interacción directa con un mRNA mostraron que se unía de forma específica a la 3'UTR de *bicoid* (Ferrandon et al, 1994), aunque estudios posteriores mostraron que la interacción entre los dsRBDs y los dsRNAs *in vitro* presentan una alta afinidad pero son inespecíficos de secuencia (Ramos et al, 2000; St Johnston, 1995).

En mamíferos, Staufen1 se encuentra en gránulos de transporte y regulación de la traducción de mRNAs (Brendel et al, 2004; Kanai et al, 2004; Mallardo et al, 2003; Tang et al, 2001; Villacé et al, 2004). Desde hace años, una de las cuestiones más importantes en el campo es dilucidar cuales son los mRNAs que se asocian a Staufen1 y cual es su función sobre ellos. Sorprendentemente, los primeros resultados muestran que existe un número mucho más alto de lo esperado de mRNAs que se asocian a Staufen1 ((Furic et al, 2008) y datos de esta tesis), estando alrededor del 7% del transcriptoma, y que pertenecen a grupos funcionales muy diversos (**Figura R3A**). Además, en el año 2004 se describió un nuevo mecanismo de degradación de mRNAs llamado *Staufen-mediated Decay* (SMD) en el que participa la proteína acompañada de otros elementos del NMD como Upf1 (Kim et al, 2005). Aunque en el caso del SMD se caracterizó una zona específica de la región 3'UTR de algunos mRNAs llamada *Staufen Binding Site*, esta región no está presente en todos los mRNAs diana del SMD y parece que la interacción con hStaufen1 es más dependiente de la estructura secundaria que de la secuencia (Kim et al, 2005). También se ha propuesto la interacción intermolecular de lncRNAs y 3'UTRs como mecanismo para generar el sitio de unión a Staufen1 que desencadene el SMD (Gong & Maquat, 2012). Sin embargo, aún se desconoce si existe un mecanismo más general que determine la unión de la mayoría de mRNA al complejo, siendo éste un tema de intenso estudio por numerosos grupos de investigación.

Además de mRNAs, podrían existir RNAs de otra naturaleza en los complejos de hStaufen1 que regulen tanto el contenido como el destino de los mRNAs presentes. La presencia de RNAs de pequeño tamaño proveía de una buena hipótesis de partida para determinar la posible asociación de miRNAs al complejo de hStaufen1. Tal y como se ha descrito en la **Figura R4A**, los complejos de hStaufen1 contienen al menos 17 miRNAs cuya presencia se correlaciona con la presencia de mRNAs asociados a hStaufen1 que contienen dianas de hibridación para estos

miRNAs (**Figura R4B**). Además, existen en el complejo otros mRNAs que no poseen dianas de hibridación para los miRNAs identificados (datos no mostrados).

La represión o degradación de mRNAs celulares se puede llevar a cabo por diferentes vías. Existen tanto elementos en *cis* como secuencias *zipcode* o ARE, codones de terminación de la traducción prematuros o secuencias complementarias a miRNAs susceptibles de regular los niveles de los mRNAs (Doyle & Kiebler, 2011) como factores en *trans*, proteínas y RNAs asociados como ZBP1, UPF1, Staufen1, FMRP, G3BP, TIA-1 o miRNAs (Conti & Izaurralde, 2005; Elvira et al, 2006; Kim et al, 2005; Tourriere et al, 2003; Zalfa et al, 2006) que determinan la represión o la degradación de un mRNA. Staufen1, en mamíferos, interacciona con UPF1, factor importante en la degradación de mRNAs mediante la vía del NMD y del SMD, con FMRP, proteína implicada en la represión traduccional y transporte de mRNAs y con TIA-1, responsable de la represión de la traducción de mRNAs en condiciones de estrés. Los resultados mostrados durante el desarrollo de esta Tesis sugieren que, además de los procesos descritos anteriormente, una fracción de hStaufen1 participa en la represión y degradación de mRNAs mediada por miRNAs.

1.3 Diferente eficiencia en la asociación de miRNAs a los complejos de hStaufen1

El análisis individual en células HEK293T y SHSY5Y de los 6 miRNAs seleccionados confirmaron los datos obtenidos en el *screening* (**Figura R5**), aunque la cuantificación de los resultados indica que los distintos miRNAs se asocian en diverso grado. En concreto, la unión de miR-124 al complejo es más eficaz que la del resto de miRNAs lo que se fundamenta en varias observaciones. Primero, que el valor de ΔCt de miR-124 entre la muestra TAP y la muestra hStau-TAP es mayor para miR-124 que para el resto de miRNAs. Segundo, que aún siendo el miRNA presente en menor concentración en los RNAs totales de HEK293T, es a la vez el más representado en los complejos de hStaufen1 con respecto al resto (**Figura R5**) y tercero, miR-124 se asocia preferentemente a las fracciones correspondientes a los complejos de hStaufen1 en células SHSY5Y mientras que ocurre lo contrario con el resto de miRNAs (**Figura R6B**).

1.4 Más importante que el “cómo”, es el “cuándo”

El miRNA 124 es importante para la correcta diferenciación de células neuronales y su sobreexpresión, y junto a miR-9, es suficiente para la conversión de fibroblastos de ratón en neuronas (Conaco et al, 2006; Makeyev et al, 2007; Packer et al, 2008; Yoo et al, 2009; Yoo et al, 2011). El aumento en la expresión de miR-124 durante la diferenciación de células de neuroblastoma humano (**Figura R8B**) es compatible con los estudios realizados en ratón en los

que se observó el mismo efecto (Krichevsky et al, 2003; Sempere et al, 2004) y sugiere que miR-124 podría ser importante para la diferenciación neuronal en humanos.

Los gránulos en los que se encuentra hStaufen1 en células de neuroblastoma humano sufren dos cambios significativos durante la diferenciación. El primero es un cambio significativo en el balance entre los niveles de expresión de las isoformas de 55 kDa y de 63 kDa. De este modo, se ve favorecida hacia la isoforma de 55 kDa en células en división, mientras que en células diferenciadas la expresión de las isoformas es prácticamente la misma (**Figura R7**) sin que se observen cambios en el tamaño de los complejos a los que se asocian. Se ha descrito que en células de cerebro de rata, rStaufen1 se asocia preferentemente a estructuras celulares que contienen membranas intracelulares (Kiebler et al, 1999; Kohrmann et al, 1999) y esta observación es compatible con estudios realizados con la proteína humana en los que se describe la asociación de hStaufen1 con el RER (Marión et al, 1999; Wickham et al, 1999) . Sin embargo existe una fracción de rStaufen1 no asociada a membranas intracelulares que forma complejos ribonucleoproteicos móviles que se localizan en zonas distales de la célula (Kohrmann et al, 1999). Las isoformas de rStaufen1 en estos dos tipos de estructuras tiene una distribución diferencial; mientras que en los complejos de rStaufen1 que forman parte de membranas intracelulares cuyo tamaño es mayor se asocian ambas isoformas, en los complejos no asociados a membrana cuyo tamaño es menor (650 kDa) se detecta preferentemente la isoforma de 63 kDa y además, estos últimos contienen los RNAs localizados CaMKII α y BC1. Los resultados obtenidos en esta Tesis no muestran un cambio en el tamaño de los gránulos de hStaufen1 durante la diferenciación neuronal aunque no se puede descartar que los complejos rinonucleoproteicos que participan en el transporte de mRNAs a zonas distales de la célula sean del mismo tamaño que los complejos asociados a membranas intracelulares. Donde si se observa un cambio es en la representación de miR-124 en los complejos de hStaufen1. Tal y como muestra la **Figura R9A** este miRNA pasa a estar más representado en fracciones que corresponden a complejos de menor tamaño en los que no se encuentra la proteína hStaufen1 y si las proteínas Ago2 y Rck/p54.

2-PAPEL DE hSTAUFEN1 EN DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO

El silenciamiento del gen de hStaufen1 en células de neuroblastoma humanos mediante vectores lentivirales inducibles por doxiciclina permitió analizar el efecto de hStaufen1 durante la diferenciación neuronal. De este modo, se observó que las células silenciadas presentaban una disminución del número de dendritas a partir del orden dendrítico secundario (**Figuras R16 y R17**), lo que sugería un defecto en la correcta ramificación dendrítica. Estos resultados

son compatibles con los descritos en el ratón mutante *Stau1(tm1Apa)* que expresa una proteína incapaz de unir RNAs (Vessey et al, 2008). Este ratón no presenta diferencias significativas en la formación de dendritas primarias. Sin embargo tiene una disminución en el número de ramificaciones dendríticas y esta diferencia aumenta a medida que aumenta el orden dendrítico.

2.1 Múltiples funciones para un proceso altamente regulado

El desarrollo dendrítico es un proceso muy complejo que consta de varias fases, algunas de las cuales son solapantes, y que se pueden dividir de manera simplificada en: 1) iniciación, orientación y extensión neurítica, 2) ramificación y formación de zonas sinápticas y 3) estabilización (Kossel et al, 1997; Scott & Luo, 2001; Wu et al, 1999). Estos procesos se llevan a cabo por la combinación de factores tanto externos como internos (**Figura D1**) que reorganizan el citoesqueleto, la síntesis de proteínas, la membrana e incluso el programa genético celular y ocurren tanto a nivel global en la célula como a nivel local en las dendritas (Urbanska et al, 2008).

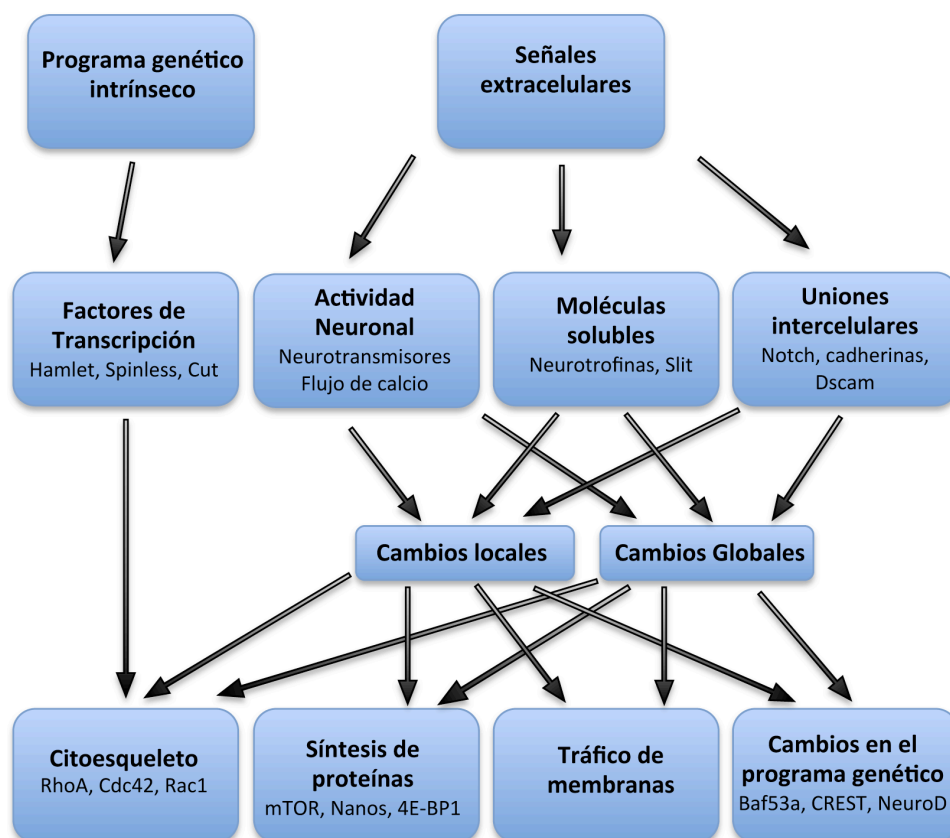
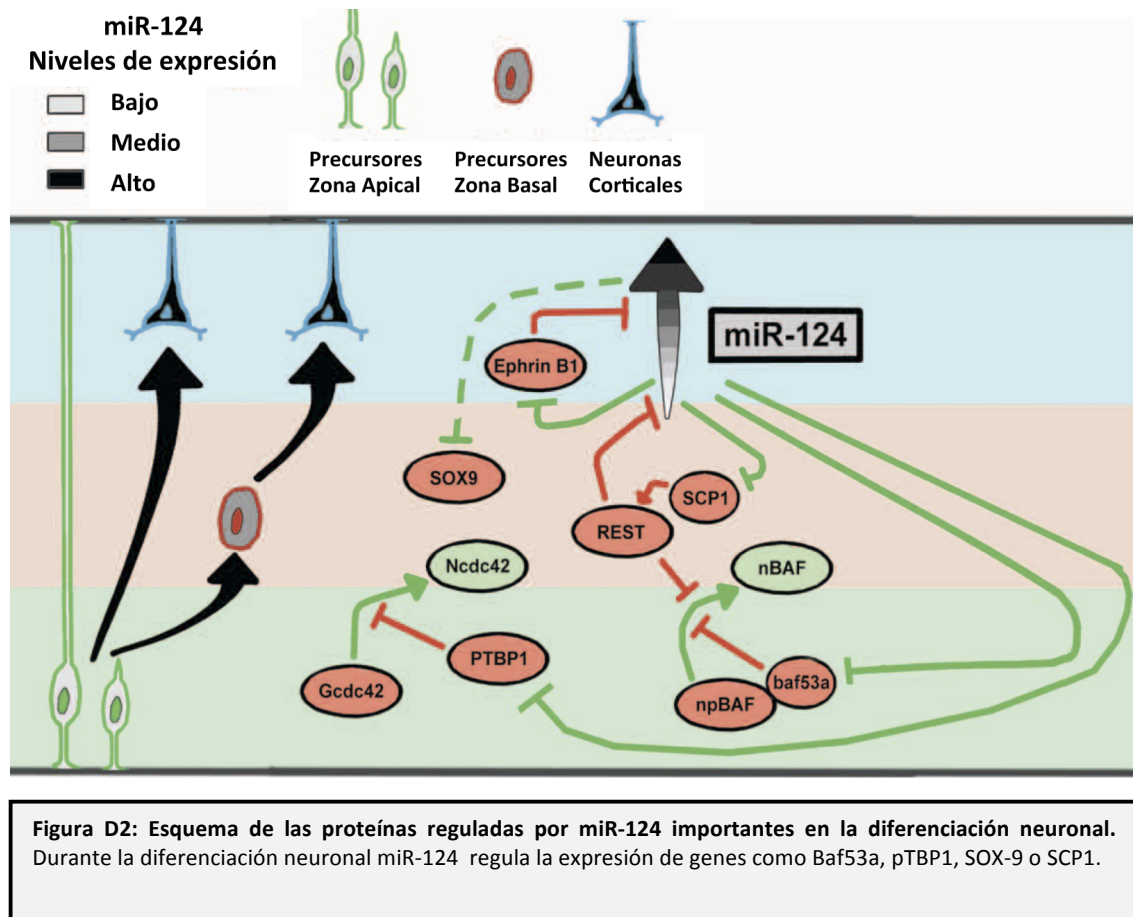


Figura D1: Diagrama de los factores importantes durante la diferenciación neuronal y la relación que existe entre ellos

El hecho de que las dendritas primarias de neuronas diferenciadas no se vean afectadas ni en número ni en longitud por la disminución de la expresión de hStaufen1, mientras que las dendritas de ordenes superiores si sufren una disminución en su número, sugiere que hStaufen1 podría tener un papel en dos de las fases anteriores, es decir en la ramificación dendrítica y en la estabilización de estructuras. Analizando cada fase en detalle, hStaufen1 podría participar en la localización de mRNAs esenciales para el crecimiento y el mantenimiento dendrítico como es el caso de los mRNAs CamKII α y β -actina. Estos mRNAs están presentes en los complejos de Staufen1 (Kanai et al, 2004; Mallardo et al, 2003; Vessey et al, 2008) y además se observó que el ratón mutante Stau1 (tm1Apa) presenta una disminución del número de partículas que contienen el mRNA de β -actina en células neuronales diferenciadas. Por otro lado, datos obtenidos por S. de Lucas (datos no publicados) mediante secuenciación masiva de los RNAs asociados a los complejos de hStaufen1, muestran la asociación a dichos complejos del mRNA que codifica el remodelador de citoesqueleto hENA, importante en la ramificación dendrítica y la formación de filopodios y lamelipodios, reforzando la hipótesis de que hStaufen1 participa en el transporte de mRNAs importantes para dicho proceso. Del mismo modo, hStaufen1 podría contribuir a la estabilización de las estructuras dendríticas ya que es importante en la respuesta a la potenciación a largo plazo a través del receptor NMDA y que participa en la correcta maduración de las espinas sinápticas (Lebeau et al, 2008; Vessey et al, 2008). Por último, hStaufen1 podría tener un efecto a nivel global participando en la regulación de la traducción mediada por miRNAs de mRNAs que codifican proteínas moduladoras de la diferenciación neuronal. Tal y como se ha descrito en esta Tesis, miR-124 se une específicamente a los complejos de hStaufen1 (**Figura R5A y R6B**). Este miRNA regula la expresión de genes como el factor de transcripción SOX9, el factor de splicing pTBP1, el componente del complejo sinaptonémico SCP1 o el remodelador de cromatina baf53a, todos ellos importantes para la diferenciación de precursores neuronales a neuronas (**Figura D2**) (Cheng et al, 2009b; Makeyev et al, 2007; Visvanathan et al, 2007; Yoo et al, 2009). Al analizar la presencia de estos mRNAs en los complejos en los datos obtenidos por transcriptómica (**Figura R3, Anexo 1** material suplementario) o en los datos obtenidos por secuenciación masiva de mRNAs asociados al complejo de hStaufen1 (de Lucas S. datos no publicados) se observó que sólo pTBP1 aparece asociado a los complejos donde está presente hStaufen1. Hay que tener en cuenta que los datos de transcriptómica están realizados en células HEK293T que aunque presentan ciertos marcadores de origen neuronal podrían no expresar los mRNAs específicos de diferenciación neuronal. Teniendo en cuenta todos estos datos, podemos sugerir que hStaufen1 podría estar participando en la modulación del nivel de

expresión de pTBP1 mediado por la hibridación de miR-124, durante la diferenciación de células de neuroblastoma humano *in vitro*.



2.2 ¿Podría hStaufen1 ser un factor causante de enfermedades mentales?

La proteína FMRP es una proteína de unión a RNA que participa en la regulación de la traducción de mRNAs tanto *in vivo* como *in vitro* y se asocia a complejos ribonucleoproteicos y a polisomas, en este último caso en la base y/o en el interior de las espinas dendríticas (Ashley et al, 1993; Feng et al, 1997; Lagerbauer et al, 2001; Li et al, 2001). Además, se asocia a proteínas del complejo RISC, al RNA no codificante de pequeño tamaño BC1 (Barbee et al, 2006; Zalfa et al, 2003) y a miRNAs. Mutaciones en el gen provocan el síndrome X frágil, una de las causas más comunes de retraso mental (Warren & Ashley, 1995). La similitud de funciones entre FMRP y hStaufen1, y teniendo en cuenta que además ambas proteínas colocalizan en gránulos neuronales (Barbee et al, 2006; Villacé et al, 2004), sugieren que la ausencia del gen de hStaufen1 podría tener consecuencias en el correcto desarrollo del cerebro. Sin embargo el ratón mutante *Stau1(tm1Apa)* no presenta deficiencias en el aprendizaje ni en la memoria

(Vessey et al, 2008) como si ocurre en ratones deficientes en FMRP (Bakker & Oostra, 2003) aunque si se observa un leve defecto en la actividad locomotriz entre los ratones mutantes y silvestres al separar machos y hembras. Uno de los motivos que se plantean los autores para explicar que no se detecten estas deficiencias es el hecho de que las mutaciones introducidas en estos ratones sólo afectan al RBD3. Por este motivo, aunque la capacidad de unión a RNA de la proteína esté afectada, no se descarta la posibilidad de que pueda estar realizando otras funciones independientemente de su unión a RNA durante el desarrollo neuronal.

2.3 El sistema de silenciamiento inducible como alternativa

La construcción de una línea estable de células de neuroblastoma humano en los que los niveles de la proteína Staufen1 sean regulables por tratamiento con doxiciclina permite realizar experimentos de diferenciación celular en los cuales se disminuye la expresión de la proteína en un 70% (**Figura R15**). Al basarse en una construcción lentiviral, este sistema permite transducir todo tipo de células y organismos. De este modo, sería posible construir un lentivirus con shRNAs específicos para el silenciamiento del gen de mStaufen1 en ratón, lo que permitiría analizar el efecto del silenciamiento del gen de mStaufen1 en diferentes fases del desarrollo embrionario del animal. A nivel celular el sistema permitiría analizar el efecto del silenciamiento de hStaufen1 una vez que la célula se encuentre perfectamente diferenciada con niveles endógenos de expresión de hStaufen1, y de este modo analizar aspectos como el transporte de mRNAs en dendritas maduras, el mantenimiento de estructuras, la expresión de receptores neuronales y la respuesta a estímulos entre otros.

3. PAPEL DE hSTAUFEN1 DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

3.1 Interacción con las vRNPs

El virus de la gripe contiene un genoma segmentado de RNA de polaridad negativa en forma de RNPs. La replicación y transcripción de estas RNPs tiene lugar en el núcleo de la célula infectada, aunque el ensamblaje y la morfogénesis del virus se realiza en la membrana plasmática. Por tanto, se requiere que las vRNPs paternas sean capaces de translocarse al núcleo al comienzo de la infección, que las RNPs progenie sean exportadas desde el núcleo y, una vez en el citoplasma, sean transportadas hasta los sitios de ensamblaje de los nuevos viriones. Los resultados descritos en esta Tesis muestran que hStaufen1 no sólo interacciona con las vRNPs del virus en el contexto de la infección (de Lucas et al, 2010), si no que las proteínas que la conforman, es decir, el trímero de la polimerasa y la NP (**Figuras R18B y R19**),

también son capaces de asociarse a hStaufen1 cuando son expresadas de forma heteróloga en ausencia de RNAs de origen viral. Además, tanto durante la infección como en experimentos de reconstitución de RNPs se observó que esta interacción es independiente del RBD3 de hStaufen1 y de NS1 (de Lucas et al, 2010). En el caso de la interacción con NP, ésta es independiente de RNA (**Figura R19B**) lo sugiere que la asociación puede ocurrir por la interacción proteína-proteína de manera directa o indirecta con NP.

3.2 Transporte de las vRNPs hasta la membrana celular

Durante la infección del virus de la gripe en células epiteliales de pulmón A549 se observó una que se produce una relocalización de la proteína hStaufen1, que se acumula en una zona perinuclear de la célula (**Figura R22**) a tiempos tardíos de la infección (a partir de las 6 horas). Al analizar la localización intracelular de las nuevas moléculas de vRNAs generadas mediante FISH, se observó que las vRNPs presentaban una localización muy similar a la de hStaufen1. Aunque por cuestiones técnicas no se pudo analizar su colocalización con el vRNA, las imágenes son sugerentes de que ambas se localizan en una zona perinuclear de la célula lo que sugiere que hStaufen1 pueda tener una función en el transporte de las vRNPs hasta la membrana plasmática donde se produce el empaquetamiento de los nuevos viriones. El análisis para determinar de que tipo de estructura o compartimento celular se trataba, muestra que forma parte de una zona específica del RE, próximo al MTOC, aparato de Golgi y Compartimentos Intermedios una zona con mucha actividad vesicular y de reorganización de citoesqueleto (**Figura R22 y R23**). Estos datos coinciden con diferentes estudios publicados durante el desarrollo de esta Tesis (Amorim et al, 2011; Eisfeld et al, 2011; Momose et al, 2011) en los que se describe la relocalización de las vRNPs en zonas muy similares y en las que se observa una colocalización con la proteína Rab11, proteína que participa en tráfico vesicular y en el reciclaje de endosomas. Estos estudios sugieren que una vez en el citoplasma las vRNPs se relocalizan en una zona pericentriolar cerca del complejo MTOC rica en Rab11, desde la cual se transportan hasta la membrana plasmática a través de microtúbulos. En este modelo, teniendo en cuenta que los gránulos de hStaufen1 se mueven a través de los microtúbulos y que se une a las vRNPs, hStaufen1 podría ser un elemento mediador en el transporte de las vRNPs a lo largo del citoesqueleto hasta las zonas de empaquetamiento en la membrana plasmática (**Figura D3**).

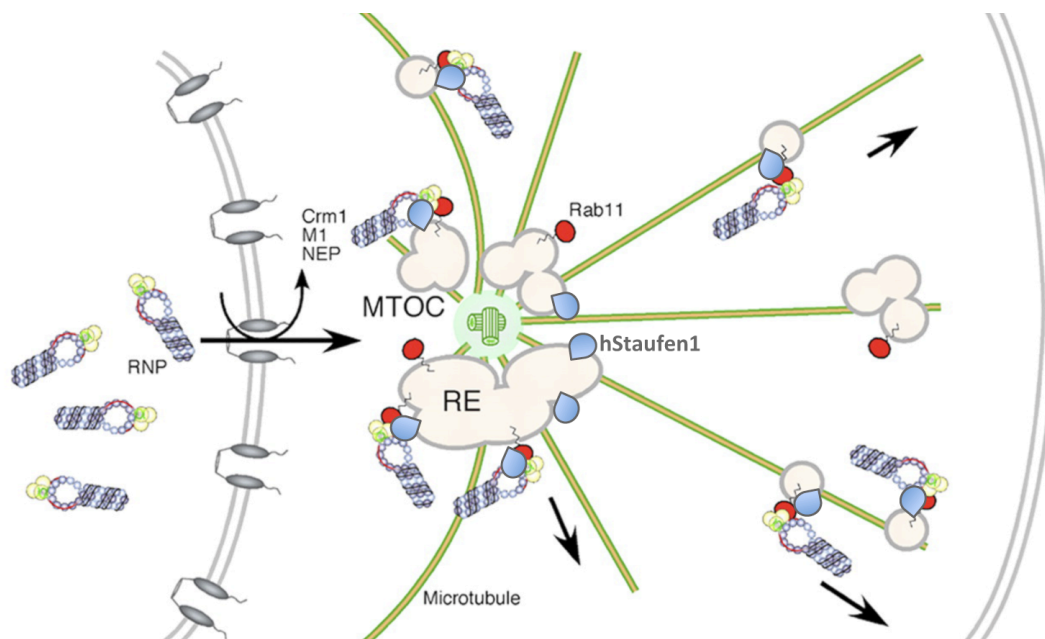


Figura D3: Modelo del transporte de las RNPs del virus de la gripe hasta la membrana plasmática. Una vez las vRNPs se translocan al citoplasma se reagrupan en una zona perinuclear cerca del MTOC y a través de vesículas que contienen Rab11 y hStaufen1 se transportan hasta la membrana plasmática dónde formarán los viriones progenie.

3.3 Morfogénesis de nuevos viriones

El silenciamiento del gen de hStaufen1 provoca la disminución del título viral en más de 10 veces (**Figura R20B**), y sin embargo la expresión de proteínas virales no se ve afectada de manera significativa (de Lucas et al, 2010) (**Figura R21B**) o disminuye en valores no comparables con la disminución del título viral (**Figura R21B**, muestra S2). Si la ausencia de hStaufen1 afecta al transporte eficiente de las vRNPs, podría ocurrir que las nuevas partículas virales formadas tengan deficiencias en el número de vRNPs incorporadas y tengan menos capacidad infectiva. Sin embargo, la purificación de los viriones obtenidos en estas células lo que muestra una reducción en la cantidad de viriones, sin que se observen cambios morfológicos evidentes en ellos (dato no mostrado) ni una significativa alteración de los segmentos genómicos incorporados en el virión (de Lucas et al, 2010). Además, los experimentos encaminados a comprobar si hStaufen1 se incorporaba en el virión de gripe al igual que ocurre en el caso del VIH (Chatel-Chaix et al, 2004) no resultaron concluyentes.

Todos estos datos refuerzan la idea planteada en los apartados anteriores, en la cual hStaufen1 participa en el transporte de las vRNPs desde su translocación al citoplasma hasta la membrana plasmática.

Conclusiones

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral son:

- 1.** La proteína hStaufen1 participa en los complejos de represión de la traducción y degradación de mRNAs mediadas por miRNAs.
- 2.** Durante la diferenciación de células de neuroblastoma humano *in vitro* se produce un cambio en el balance entre las isoformas de hStaufen1 y un cambio en la distribución del miRNA miR-124 asociado a hStaufen1 hacia complejos celulares de menor tamaño.
- 3.** La proteína hStaufen1 es necesaria para la correcta ramificación de dendritas durante la diferenciación *in vitro* de células de neuroblastoma humano.
- 4.** La proteína hStaufen1 interacciona con las vRNPs del virus de la gripe, específicamente con el complejo trimérico de la polimerasa y con la NP.
- 5.** La proteína hStaufen1 participa en la correcta formación de viriones del virus de la gripe, probablemente colaborando en el transporte de las vRNPs hasta la membrana plasmática.

Bibliografía

1. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP (2000) Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *Journal of virology* 74: 8709-8719
2. Amorim MJ, Bruce EA, Read EK, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD, Digard P (2011) A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *Journal of virology* 85: 4143-4156
3. Anderson JS, Parker RP (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *The EMBO journal* 17: 1497-1506
4. Antar LN, Afroz R, Dictenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ (2004) Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* 24: 2648-2655
5. Araki Y, Takahashi S, Kobayashi T, Kajiho H, Hoshino S, Katada T (2001) Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *The EMBO journal* 20: 4684-4693
6. Arranz R, Coloma R, Chichon FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, Valpuesta JM, Ortin J, Martin-Benito J (2012) The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science (New York, NY)* 338: 1634-1637
7. Ashley CT, Jr., Wilkinson KD, Reines D, Warren ST (1993) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science (New York, NY)* 262: 563-566
8. Avalos RT, Yu Z, Nayak DP (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *Journal of virology* 71: 2947-2958
9. Bakker CE, Oostra BA (2003) Understanding fragile X syndrome: insights from animal models. *Cytogenetic and genome research* 100: 111-123
10. Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Coller JM, Johnson N, Howlett IC, Geng C, Ueda R, Brand AH, Newbury SF, Wilhelm JE, Levine RB, Nakamura A, Parker R, Ramaswami M (2006) Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 52: 997-1009

- 11.** Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *Journal of virology* 68: 6900-6909
- 12.** Bassell GJ, Oleynikov Y, Singer RH (1999) The travels of mRNAs through all cells large and small. *Faseb J* 13: 447-454
- 13.** Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006a) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* 20: 1885-1898
- 14.** Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E (2006b) MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71: 523-530
- 15.** Beloso A, Martínez C, Valcárcel J, Fernández-Santarén J, Ortín J (1992) Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J Gen Virol* 73: 575-581
- 16.** Bernstein P, Peltz SW, Ross J (1989) The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Molecular and cellular biology* 9: 659-670
- 17.** Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research* 38: 3751-3757
- 18.** Bienroth S, Keller W, Wahle E (1993) Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *The EMBO journal* 12: 585-594
- 19.** Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO journal* 17: 170-180
- 20.** Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RW, Baudin F (2007) Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus research* 124: 12-21
- 21.** Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384: 239-246
- 22.** Brengues M, Teixeira D, Parker R (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science (New York, NY)* 310: 486-489

- 23.** Briedis DJ, Conti G, Munn EA, Mahy BWJ (1981) Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cells. *Virology* 111: 154-164
- 24.** Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ (1998a) Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391: 792-795
- 25.** Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ (1998b) Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391: 792-795
- 26.** Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *The Journal of general virology* 85: 983-991
- 27.** Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, NY)* 10: 1957-1966
- 28.** Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, tom Dieck S, Fuerst N, Schuman EM (2012) The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74: 453-466
- 29.** Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & development* 16: 2733-2742
- 30.** Chatel-Chaix L, Clement JF, Martel C, Beriault V, Gagnon A, DesGroseillers L, Mouland AJ (2004) Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* 24: 2637-2648
- 31.** Chen CY, Shyu AB (2011) Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley interdisciplinary reviews* 2: 167-183
- 32.** Chen HC, Cheng SC Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience reports* 32: 345-359
- 33.** Chen Z, Li Y, Krug RM (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO journal* 18: 2273-2283
- 34.** Cheng A, Wong SM, Yuan YA (2009a) Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res* 19: 187-195

- 35.** Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009b) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature neuroscience* 12: 399-408
- 36.** Colegrove-Otero LJ, Minshall N, Standart N (2005) RNA-binding proteins in early development. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40: 21-73
- 37.** Collier J, Parker R (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122: 875-886
- 38.** Compans RW, Chopin PW (1975) Reproduction of Myxoviruses. In *Comprehensive Virology*, Fraenkel-Conrat H, Wagner RR (eds), Vol. 4, pp 179-252. New York: Plenum Press
- 39.** Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G (2006) Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2422-2427
- 40.** Conti E, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current opinion in cell biology* 17: 316-325
- 41.** Cooke C, Alwine JC (1996) The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency. *Molecular and cellular biology* 16: 2579-2584
- 42.** Coolen M, Bally-Cuif L (2009) MicroRNAs in brain development and physiology. *Current opinion in neurobiology* 19: 461-470
- 43.** Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes & development* 12: 3715-3727
- 44.** de Lucas S, Peredo J, Marion RM, Sanchez C, Ortin J (2010) Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication. *Journal of virology* 84: 7603-7612
- 45.** Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458: 914-918
- 46.** Doma MK, Parker R (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440: 561-564

- 47.** Doyle M, Kiebler MA (2011) Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO journal* 30: 3540-3552
- 48.** Dueck A, Ziegler C, Eichner A, Berezikov E, Meister G (2012) microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic acids research* 40: 9850-9862
- 49.** Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Seraphin B (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature structural & molecular biology* 14: 15-22
- 50.** Eisfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, Neumann G, Kawaoka Y (2011) RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *Journal of virology* 85: 6117-6126
- 51.** Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* 5: 635-651
- 52.** Eulalio A, Triteschler F, Izaurralde E (2009) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, NY)* 15: 1433-1442
- 53.** Falcón AM, Fernandez-Sesma A, Nakaya Y, Moran TM, Ortín J, García-Sastre A (2005) Attenuation and immunogenicity in mice of temperature-sensitive influenza viruses expressing truncated NS1 proteins. *J Gen Virol* 86: 2817-2821
- 54.** Falcón AM, Fortes P, Marión RM, Beloso A, Ortín J (1999) Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* 27: 2241-2247
- 55.** Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, Brown M, Hafner M, Reyat F, van Kouwenhove M, Kreike B, Sie D, Hovestadt V, Wessels LF, van de Vijver MJ, Tuschl T MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer research* 71: 4443-4453
- 56.** Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST (1997) FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Molecular cell* 1: 109-118

- 57.** Ferrandon D, Elphick L, Nusslein Volhard C, St Johnston D (1994) Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79: 1221-1232
- 58.** Fiore R, Khudayberdiev S, Saba R, Schratt G MicroRNA function in the nervous system. *Progress in molecular biology and translational science* 102: 47-100
- 59.** Fortes P, Beloso A, Ortín J (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J* 13: 704-712
- 60.** Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, NY)* 14: 324-335
- 61.** Furuichi Y (1977) [An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus-2 messenger RNA (author's transl)]. *Tanpakushitsu kakusan koso* 22: 1201-1204
- 62.** Garaigorta U, Falcon AM, Ortín J (2005) Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *Journal of virology* 79: 15246-15257
- 63.** Garaigorta U, Ortín J (2007) Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic acids research* 35: 4573-4582
- 64.** Garfinkel MS, Katze MG (1992) Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* 267: 9383-9390
- 65.** Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113-126
- 66.** Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-1423
- 67.** Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *Journal of virology* 77: 7214-7224

- 68.** Gilmartin GM (2005) Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. *Genes & development* 19: 2517-2521
- 69.** Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J (2006) Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *Journal of neuroscience research* 84: 755-767
- 70.** Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *Journal of virology* 74: 11538-11547
- 71.** Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez-Pastrana E, Portela A (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* 80: 1635-1645
- 72.** Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE (2009) SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development* 23: 54-66
- 73.** Gong C, Maquat LE (2012) lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* 470: 284-288
- 74.** Goodrich JA, Tjian R (1994) TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Current opinion in cell biology* 6: 403-409
- 75.** Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36: 59-74
- 76.** Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE (2006) Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *The Journal of biological chemistry* 281: 1857-1867
- 77.** Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortin J, Hart DJ, Cusack S (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature structural & molecular biology* 15: 500-506
- 78.** Habig JW, Dale T, Bass BL (2007) miRNA editing--we should have inosine this coming. *Molecular cell* 25: 792-793
- 79.** Hamm J, Mattaj IW (1990) Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* 63: 109-118

- 80.** Hatada E, Saito S, Fukuda R (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *Journal of virology* 73: 2425-2433
- 81.** Hatada E, Saito S, Okishio N, Fukuda R (1997) Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* 78: 1059-1063
- 82.** Hatada E, Takizawa T, Fukuda R (1992) Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol* 73: 17-25
- 83.** Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H (2005) Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 435: 974-978
- 84.** Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69: 577-578
- 85.** Hernandez H, Dziembowski A, Taverner T, Seraphin B, Robinson CV (2006) Subunit architecture of multimeric complexes isolated directly from cells. *EMBO reports* 7: 605-610
- 86.** Hirokawa N (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* 26: 7139-7142
- 87.** Holsinger LJ, Lamb RA (1991) Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183: 32-43
- 88.** Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA (1992) Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* 66: 4901-4908
- 89.** Horne RW, Waterson AP, Wildy P, Famham AE (1960) The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies on the structure of myxoviruses particles by negative staining techniques. *Virology* 11: 79-88
- 90.** Hoyle L, Horne RW, Waterson AP (1961) The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* 13: 448-459
- 91.** Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 8140-8144

- 92.** Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P (2010) Genome packaging in influenza A virus. *The Journal of general virology* 91: 313-328
- 93.** Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dictenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438: 512-515
- 94.** Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, NY)* 293: 834-838
- 95.** Hwang J, Sato H, Tang Y, Matsuda D, Maquat LE UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Molecular cell* 39: 396-409
- 96.** Inoue K, Ohno M, Sakamoto H, Shimura Y (1989) Effect of the cap structure on pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocyte nuclei. *Genes & development* 3: 1472-1479
- 97.** Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y (2006) The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *Journal of virology* 80: 5233-5240
- 98.** Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj IW (1994) A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78: 657-668
- 99.** Izaurralde E, Mattaj IW (1992) Transport of RNA between nucleus and cytoplasm. *Semin Cell Biol* 3: 279-288
- 100.** Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2012) Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology* 86: 45-93
- 101.** Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efsthathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P (2012) An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science (New York, NY)* 337: 199-204
- 102.** Jankowsky E (2011) RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends in biochemical sciences* 36: 19-29

- 103.** Jenny A, Hauri HP, Keller W (1994) Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100-kilodalton subunit. *Molecular and cellular biology* 14: 8183-8190
- 104.** Jorba N, Coloma R, Ortin J (2009) Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS pathogens* 5: e1000462
- 105.** Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43: 513-525
- 106.** Katahira J, Yoneda Y (2009) Roles of the TREX complex in nuclear export of mRNA. *RNA biology* 6: 149-152
- 107.** Katze MG, Krug RM (1990) Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* 44: 265-277
- 108.** Kawahara Y, Nishikura K (2009) [Regulation of the miRNA function by RNA editing]. *Tanpakushitsu kakusan koso* 54: 1133-1140
- 109.** Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K (2007) Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science (New York, NY)* 315: 1137-1140
- 110.** Kawamata T, Tomari Y (2010) Making RISC. *Trends in biochemical sciences* 35: 368-376
- 111.** Kedersha N, Anderson P (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society transactions* 30: 963-969
- 112.** Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* 169: 871-884
- 113.** Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* 147: 1431-1442
- 114.** Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 15: 2654-2659

- 115.** Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, Ortin J, Dotti CG (1999) The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19: 288-297
- 116.** Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G (2004) Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 360-365
- 117.** Kim TK, Ebright RH, Reinberg D (2000) Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science (New York, NY)* 288: 1418-1422
- 118.** Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120: 195-208
- 119.** Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *American journal of physiology* 284: C273-284
- 120.** Kimble J, Crittenden SL (2005) Germline proliferation and its control. *WormBook*: 1-14
- 121.** Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, Taneja KL (1993) Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *The Journal of cell biology* 123: 165-172
- 122.** Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH (1994) Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *The Journal of cell biology* 127: 441-451
- 123.** Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO journal* 16: 1248-1257
- 124.** Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L (2007) Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology* 81: 7011-7021
- 125.** Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Molecular biology of the cell* 10: 2945-2953

- 126.** Kossel AH, Williams CV, Schweizer M, Kater SB (1997) Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J Neurosci* 17: 6314-6324
- 127.** Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS (2003) A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA (New York, NY)* 9: 1274-1281
- 128.** Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS (2006) Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24: 857-864
- 129.** Krug A, Bianchi R, Hille A, Herrera M, Etcheverry R, Peredo M, Farias S, Rojas E (1976) [Cyclophosphamide in the prevention of sensitization to Rh factor]. *Rev Chil Obstet Ginecol* 41: 290-294
- 130.** Krug RM, Alonso-Kaplen FV, Julkunen I, Katze MG (1989) Expression and replication of the influenza virus genome. In *The influenza viruses*, Krug RM (ed), pp 89-152. New York: Plenum Press
- 131.** Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci* 17: 2508-2540
- 132.** Lagerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Human molecular genetics* 10: 329-338
- 133.** Landthaler M, Gaidatzis D, Rothballer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, Ojo T, Hafner M, Zavolan M, Tuschl T (2008) Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA (New York, NY)* 14: 2580-2596
- 134.** Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO journal* 19: 6860-6869
- 135.** Le Hir H, Seraphin B (2008) EJCs at the heart of translational control. *Cell* 133: 213-216
- 136.** Lebeau G, DesGroseillers L, Sossin W, Lacaille JC (2011) mRNA binding protein stau1-dependent regulation of pyramidal cell spine morphology via NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *Mol Brain* 4: 22
- 137.** Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, Lacaille JC (2008) Stau1 regulation of protein synthesis-dependent long-term

potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Molecular and cellular biology* 28: 2896-2907

138. Lee JH, Oh JY, Pascua PN, Kim EG, Choi YK, Kim HK (2011) Impairment of the Stauf1-NS1 interaction reduces influenza viral replication. *Biochemical and biophysical research communications* 414: 153-158

139. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419

140. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23: 4051-4060

141. Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18125-18130

142. Levanon EY, Hallegger M, Kinar Y, Shemesh R, Djinovic-Carugo K, Rechavi G, Jantsch MF, Eisenberg E (2005) Evolutionarily conserved human targets of adenosine to inosine RNA editing. *Nucleic acids research* 33: 1162-1168

143. Li F, Ge P, Hui WH, Atanasov I, Rogers K, Guo Q, Osato D, Falick AM, Zhou ZH, Simpson L (2009) Structure of the core editing complex (L-complex) involved in uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 12306-12310

144. Li J, Wan Y, Ji Q, Fang Y, Wu Y (2013) The role of microRNAs in B-cell development and function. *Cellular & molecular immunology*

145. Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic acids research* 29: 2276-2283

146. Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM (1995) Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *Journal of virology* 69: 1099-1106

147. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* 7: 719-723

148. Liu Q, Greimann JC, Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127: 1223-1237

- 149.** Lykke-Andersen J (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Molecular and cellular biology* 22: 8114-8121
- 150.** Ma XM, Yoon SO, Richardson CJ, Julich K, Blenis J (2008) SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* 133: 303-313
- 151.** Madin SH, Darby NB, Jr. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 98: 574-576
- 152.** Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell* 27: 435-448
- 153.** Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2100-2105
- 154.** Marión RM, Aragón T, Beloso A, Nieto A, Ortín J (1997) The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic Acids Res* 25: 4271-4277
- 155.** Marión RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortín J (1999) A human sequence homologue of staufen is an RNA-binding protein that localizes to the polysomes of the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19: 2212-2219
- 156.** Martinez J, Ren YG, Nilsson P, Ehrenberg M, Virtanen A (2001) The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *The Journal of biological chemistry* 276: 27923-27929
- 157.** Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & development* 19: 1512-1517
- 158.** McCown MF, Pekosz A (2006) Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *Journal of virology* 80: 8178-8189
- 159.** Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* 58: 167-176

- 160.** Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 15: 185-197
- 161.** Mena I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* 75: 2109-2114
- 162.** Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of virology* 81: 514-524
- 163.** Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y (2011) Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PloS one* 6: e21123
- 164.** Mouland AJ, Mercier J, Luo M, Bernier L, DesGroseillers L, Cohen EA (2000) The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *Journal of virology* 74: 5441-5451
- 165.** Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y (2012) Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of virology* 87: 2455-2462
- 166.** Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S (2009) Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research* 143: 147-161
- 167.** Nayak DP, Hui EK, Barman S (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* 106: 147-165
- 168.** Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *The EMBO journal* 19: 6751-6758
- 169.** Newmark PA, Boswell RE (1994) The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in Drosophila. *Development* 120: 1303-1313
- 170.** Noda T, Kawaoka Y (2010) Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Reviews in medical virology* 20: 380-391

- 171.** Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439: 490-492
- 172.** O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal* 17: 288-296
- 173.** Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, Nieto A, Ortín J, Skehel JJ, Portela A (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* 37: 305-315
- 174.** Ohlson J, Pedersen JS, Haussler D, Ohman M (2007) Editing modifies the GABA(A) receptor subunit alpha3. *RNA (New York, NY)* 13: 698-703
- 175.** Orban TI, Izaurralde E (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA (New York, NY)* 11: 459-469
- 176.** Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & development* 10: 2657-2683
- 177.** Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL (2008) The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 28: 14341-14346
- 178.** Pain VM (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 236: 747-771
- 179.** Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61: 397-410
- 180.** Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M (2007) Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449: 919-922
- 181.** Pesiridis GS, Tripathy K, Tanik S, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) A "two-hit" hypothesis for inclusion formation by carboxyl-terminal fragments of TDP-43 protein linked to RNA depletion and impaired microtubule-dependent transport. *The Journal of biological chemistry* 286: 18845-18855
- 182.** Piccirillo C, Khanna R, Kiledjian M (2003) Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *RNA (New York, NY)* 9: 1138-1147

- 183.** Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69: 517-528
- 184.** Pullirsch D, Jantsch MF (2010) Proteome diversification by adenosine to inosine RNA editing. *RNA biology* 7: 205-212
- 185.** Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA (New York, NY)* 1: 304-316
- 186.** Radford HE, Meijer HA, de Moor CH (2008) Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1779: 217-229
- 187.** Raker VA, Plessel G, Luhrmann R (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *The EMBO journal* 15: 2256-2269
- 188.** Ramos A, Grunert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, Freund S, Bycroft M, St JD, Varani G (2000) RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *The EMBO journal* 19: 997-1009
- 189.** Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, NY)* 11: 1640-1647
- 190.** Reines D, Conaway JW, Conaway RC (1996) The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends in biochemical sciences* 21: 351-355
- 191.** Robertson JS (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acid Research* 6: 3745-3757
- 192.** Sachs AB, Deardorff JA (1992) Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70: 961-973
- 193.** Salvatore M, Basler CF, Parisien JP, Horvarth CM, Bourmakina S, Zheng H, Muster T, Palese P, García-Sastre A (2002) Effects of Influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J of Virol* 76: 1206-1212
- 194.** Schwartz DC, Parker R (1999) Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 19: 5247-5256

- 195.** Schwartz DC, Parker R (2000) mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* 20: 7933-7942
- 196.** Scott EK, Luo L (2001) How do dendrites take their shape? *Nature neuroscience* 4: 359-365
- 197.** Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology* 5: R13
- 198.** Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature cell biology* 7: 633-636
- 199.** Shapiro GI, Gurney TJ, Krug RM (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *Journal of virology* 61: 764-773
- 200.** Shen CP, Knoblich JA, Chan YM, Jiang MM, Jan LY, Jan YN (1998) Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufer and Prospero during asymmetric cell division in Drosophila. *Genes & development* 12: 1837-1846
- 201.** Skehel JJ, Hay AJ (1978) Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza virus RNAs and their transcripts. *Nucleic Acid Research* 5: 1207-1219
- 202.** Skehel JJ, Wiley DC (1995) Influenza viruses and cell membranes. *American journal of respiratory and critical care medicine* 152: S13-15
- 203.** Skehel JJ, Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry* 69: 531-569
- 204.** Smith GL, Hay AJ (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology* 118: 96-108
- 205.** St Johnston D (1995) The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81: 161-170
- 206.** St Johnston D, Beuchle D, Nusslein VC (1991) Staufer, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* 66: 51-63

- 207.** St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10979-10983
- 208.** Stegmann T, Booy FP, Wilschut J (1987a) Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *The Journal of biological chemistry* 262: 17744-17749
- 209.** Stegmann T, Morselt HW, Booy FP, van Breemen JF, Scherphof G, Wilschut J (1987b) Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *The EMBO journal* 6: 2651-2659
- 210.** Steiger M, Carr-Schmid A, Schwartz DC, Kiledjian M, Parker R (2003) Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA (New York, NY)* 9: 231-238
- 211.** Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK, Anderson P (2004) MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO journal* 23: 1313-1324
- 212.** Takada K, Shiota M, Ando M, Kimura M, Inoue K (1989) Porencephaly and hydranencephaly: a neuropathological study of four autopsy cases. *Brain Dev* 11: 51-56
- 213.** Tan GS, Garchow BG, Liu X, Yeung J, Morris JPt, Cuellar TL, McManus MT, Kiriakidou M (2009) Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic acids research* 37: 7533-7545
- 214.** Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E (2001) A role for a rat homolog of stau1 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32: 463-475
- 215.** Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL (2005) Stau1 recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Molecular biology of the cell* 16: 405-420
- 216.** Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of cell biology* 160: 823-831
- 217.** Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J (2008) Molecular basis of dendritic arborization. *Acta neurobiologiae experimentalis* 68: 264-288
- 218.** van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Seraphin B (2002) Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *The EMBO journal* 21: 6915-6924

- 219.** van Eeden FJ, Palacios IM, Petronczki M, Weston MJ, St Johnston D (2001) Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *The Journal of cell biology* 154: 511-523
- 220.** van Hoof A, Parker R (2002) Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr Biol* 12: R285-287
- 221.** Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, Wieczorek K, Vendra G, Riefler J, Tubing F, Aparicio SA, Abel T, Kiebler MA (2008) A loss of function allele for murine Stauf1 leads to impairment of dendritic Stauf1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 16374-16379
- 222.** Villacé P, Marión RM, Ortín J (2004) The composition of Stauf1-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32: 2411-2420
- 223.** Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2007) The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes & development* 21: 744-749
- 224.** Vreede FT, Chan AY, Sharps J, Fodor E Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells. *Virology* 396: 125-134
- 225.** Warren ST, Ashley CT, Jr. (1995) Triplet repeat expansion mutations: the example of fragile X syndrome. *Annual review of neuroscience* 18: 77-99
- 226.** Warren ST, Nelson DL (1994) Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *Jama* 271: 536-542
- 227.** Weinmann L, Hock J, Ivancevic T, Ohrt T, Mutze J, Schwille P, Kremmer E, Benes V, Urlaub H, Meister G (2009) Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell* 136: 496-507
- 228.** Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333: 426-431
- 229.** Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L (1999) Mammalian Stauf1 is a double-stranded RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19: 2220-2227

- 230.** Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *Journal of cell science* 118: 981-992
- 231.** Wilusz CJ, Gao M, Jones CL, Wilusz J, Peltz SW (2001) Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *RNA (New York, NY)* 7: 1416-1424
- 232.** Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P (2009) A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of virology* 83: 8021-8031
- 233.** Wu GY, Zou DJ, Rajan I, Cline H (1999) Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *J Neurosci* 19: 4472-4483
- 234.** Yanguéz E, Nieto A (2011) So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus research* 156: 1-12
- 235.** Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR (2009) MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 460: 642-646
- 236.** Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476: 228-231
- 237.** Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* 458: 909-913
- 238.** Zalfa F, Achsel T, Bagni C (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Current opinion in neurobiology* 16: 265-269
- 239.** Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112: 317-327
- 240.** Zebedee SL, Lamb RA (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* 62: 2762-2772

241. Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, Singer RH, Bassell GJ (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31: 261-275

Anexos

Anexo1: Tabla de mRNAs asociados a hStaufen1

| Affimetrix ID | Símbolo del gen | Nombre oficial del gen | Fold Change |
|---------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 53071_s_at | FLJ22222 | Chromosome 17 open reading frame 101 | 4.04 |
| 228868_x_at | CDT1 | Chromatin licensing and DNA replication factor 1 | 4.05 |
| 227667_at | CUEDC1 | CUE domain containing 1 | 4.07 |
| 214395_x_at | EEF1D | Eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein) | 4.12 |
| 212496_s_at | JMJD2B | Jumonji domain containing 2B | 4.12 |
| 218208_at | PQLC1 | PQ loop repeat containing 1 | 4.12 |
| 47069_at | ARHGAP8 | Rho GTPase activating protein 8 | 4.13 |
| 223394_at | SERTAD1 | SERTA domain containing 1 | 4.13 |
| 227203_at | FBXL17 | F-box and leucine-rich repeat protein 17 | 4.16 |
| 201827_at | SMARCD2 | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, d 2 | 4.16 |
| 212512_s_at | CARM1 | Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 | 4.20 |
| 220201_at | MNAB | Membrane associated DNA binding protein | 4.20 |
| 37005_at | NBL1 | Neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1 | 4.22 |
| 238956_at | LOC100506781 | NA | 4.23 |
| 1553960_at | C20orf161 | Chromosome 20 open reading frame 161 | 4.27 |
| 220409_at | CAMSAP1 | Calmodulin regulated spectrin-associated protein 1 | 4.30 |
| 222620_s_at | DNAJC1 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1 | 4.3 |
| 218081_at | C20orf27 | Chromosome 20 open reading frame 27 | 4.31 |
| 231017_at | STK11 | Serine/threonine kinase 11 | 4.32 |
| 213275_x_at | CTSB | Cathepsin B | 4.33 |
| 224715_at | WDR34 | WD repeat domain 34 | 4.34 |
| 222206_s_at | NCLN | Nicalin homolog (zebrafish) | 4.36 |
| 218145_at | TRIB3 | Tribbles homolog 3 (Drosophila) | 4.40 |
| 90265_at | CENTA1 | Centaurin, alpha 1 | 4.41 |
| 202894_at | EPHB4 | EPH receptor B4 | 4.42 |
| 1555894_s_at | MTSS1L | Metastasis suppressor 1-like | 4.53 |
| 229269_x_at | SSBP4 | Single stranded DNA binding protein 4 | 4.53 |
| 219983_at | HRASLS | HRAS-like suppressor | 4.58 |
| 225699_at | C7orf40 | Chromosome 7 open reading frame 40 | 4.62 |
| 230972_at | ANKRD9 | Ankyrin repeat domain 9 | 4.64 |
| 224576_at | ERGIC1 | Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1 | 4.64 |
| 224598_at | MGAT4B | Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B | 4.65 |
| 202329_at | CSK | c-src tyrosine kinase | 4.66 |
| 227994_x_at | C20orf149 | Chromosome 20 open reading frame 149 | 4.67 |
| 214149_s_at | ATP6V0E | ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e | 4.69 |
| 203103_s_at | PRPF19 | PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S. cerevisiae) | 4.72 |
| 209037_s_at | EHD1 | EH-domain containing 1 | 4.79 |
| 49452_at | ACACB | Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta | 4.90 |

| | | | |
|-------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 233571_x_at | C20orf149 | Chromosome 20 open reading frame 149 | 4.90 |
| 222288_at | NA | NA | 4.92 |
| 213813_x_at | FTL | Ferritin, light polypeptide | 4.93 |
| 217118_s_at | C22orf9 | Chromosome 22 open reading frame 9 | 4.94 |
| 213587_s_at | ATP6V0E2 | ATPase, H+ transporting V0 subunit e2 | 5.08 |
| 212303_x_at | KHSRP | KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2) | 5.08 |
| 206298_at | ARHGAP22 | Rho GTPase activating protein 22 | 5.12 |
| 217598_at | CINP | NA | 5.19 |
| 214021_x_at | ITGB5 | Integrin, beta 5 | 5.22 |
| 224477_s_at | NUDT16L1 | Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16-like 1 | 5.23 |
| 223677_at | ATG10 | ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae) | 5.29 |
| 213183_s_at | CDKN1C | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) | 5.38 |
| 50376_at | ZNF444 | Zinc finger protein 444 | 5.39 |
| 212155_at | RNF187 | Ring finger protein 187 | 5.46 |
| 33736_at | STOML1 | Stomatin (EPB72)-like 1 | 5.46 |
| 206397_x_at | GDF1 | Growth differentiation factor 1 | 6.01 |
| 205449_at | SAC3D1 | SAC3 domain containing 1 | 6.01 |
| 241937_s_at | WDR4 | WD repeat domain 4 | 6.01 |
| 225969_at | ALKBH6 | AlkB, alkylation repair homolog 6 (E. coli) | 6.10 |
| 43544_at | THRAP5 | Thyroid hormone receptor associated protein 5 | 6.22 |
| 223284_at | NAT14 | N-acetyltransferase 14 (GCN5-related, putative) | 6.46 |
| 236626_at | ALG1 | Asparagine-linked glycosylation 1 homolog (yeast, beta-1,4-mannosyltransferase) | 6.78 |
| 225329_at | FAM195B | Family with sequence similarity 195, member B | 6.78 |
| 225954_s_at | MIDN | Midnolin | 7.15 |
| 50221_at | TFEB | Transcription factor EB | 7.36 |
| 33778_at | TBC1D22A | TBC1 domain family, member 22A | 7.93 |
| 230699_at | PGLS | 6-Phosphogluconolactonase | 9.87 |
| 210683_at | NRTN | Neurturin | 13.49 |

Human Stau1 Protein Interacts with Influenza Virus Ribonucleoproteins and Is Required for Efficient Virus Multiplication[▽]

Susana de Lucas, Joan Peredo, Rosa María Marión,[†] Carmen Sánchez, and Juan Ortín^{*}

Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional Biotecnología (CSIC) and CIBER de Enfermedades Respiratorias (ISCIII), Darwin 3, Campus Cantoblanco, Madrid 28049, Spain

Received 6 March 2010/Accepted 18 May 2010

The influenza A virus genome consists of 8 negative-stranded RNA segments. NS1 is a nonstructural protein that participates in different steps of the virus infectious cycle, including transcription, replication, and morphogenesis, and acts as a virulence factor. Human Stau1 (hStau1), a protein involved in the transport and regulated translation of cellular mRNAs, was previously identified as a NS1-interacting factor. To investigate the possible role of hStau1 in the influenza virus infection, we characterized the composition of hStau1-containing granules isolated from virus-infected cells. Viral NS1 protein and ribonucleoproteins (RNPs) were identified in these complexes by Western blotting, and viral mRNAs and viral RNAs (vRNAs) were detected by reverse transcription (RT)-PCR. Also, colocalization of hStau1 with NS1, nucleoprotein (NP), and PA in the cytosol of virus-infected cells was shown by immunofluorescence. To analyze the role of hStau1 in the infection, we downregulated its expression by gene silencing. Human HEK293T cells or A549 cells were silenced using either short hairpin RNAs (shRNAs) or small interfering RNAs (siRNAs) targeting four independent sites in the hStau1 mRNA. The yield of influenza virus was reduced 5 to 10 times in the various hStau1-silenced cells compared to that in control silenced cells. The expression levels of viral proteins and their nucleocytoplasmic localization were not affected upon hStau1 silencing, but virus particle production, as determined by purification of virions from supernatants, was reduced. These results indicate a role for hStau1 in late events of the influenza virus infection, possibly during virus morphogenesis.

The influenza A virus genome is formed by eight segments of negative-sense, single-stranded RNA that encode 12 different proteins, nine of which are present in the virion (43, 57). Genomic RNAs form viral ribonucleoprotein (RNP) complexes (vRNPs) by association with viral RNA (vRNA) polymerase and nucleoprotein (NP). The polymerase complex is formed by the PA, PB1, and PB2 proteins and carries out both viral transcription and replication events in the cell nucleus (28, 29). The influenza virus genome encodes two nonstructural proteins, NS1 and the more recently identified PB1-F2 (11). NS1 accumulates in the nucleus at early times postinfection and in both the nucleus and cytoplasm at later times (6). The existence of mutant viruses lacking NS1 (22, 33) suggests that it is not the product of an essential gene, although the phenotypes of NS1 point and deletion mutants indicate that its function may be related to transcription and replication events (18), late-viral synthesis (27), modulation of the innate immune response (15), and viral morphogenesis (20) (reviewed in reference 26). Such a variety of roles may be related to the capacity of NS1 to interact with viral RNPs (39) and also with cellular factors, such as proteins involved in posttranslational processing of mRNAs, such as cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) (41), NS1-BP (58), proteins of the nuclear pore complex (47), proteins involved in interferon

signaling (such as PKR and RIG-I) (36, 40) or involved in translation (PABP, eIF4G, and Stau1) (1, 7, 17).

Human Stau1 (hStau1) was first identified in a yeast two-hybrid screen using NS1 as bait (17). It is the human homologue to *Drosophila melanogaster* Stau1 (dmStau), a protein essential for the proper localization of certain mRNAs during the formation of the anteroposterior axis of the embryo of *D. melanogaster* and for the asymmetric division of neuroblasts (19). The hStau1 protein is associated with polysomes and localizes in dendrites of cultured neurons in structures called RNA granules (32, 54). The size of these granules is about 10 MDa, and their composition, including cytoskeleton proteins such as tubulin and actin, motor proteins, such as kinesin and dynein, ribosomal proteins, and proteins involved in the regulation of translation, suggests a role for hStau1 in the transport and localized translation of mRNAs (54). Previous data have shown that hStau1 and NS1 proteins are associated to the polysome fraction of influenza virus-infected cells and coimmunoprecipitate both in infected and cotransfected cells. Furthermore, the overexpression of both proteins from cDNA induces the redistribution of hStau1 from the cytoplasm to the nucleus (17). On the other hand, hStau1 has been shown to participate in HIV virion assembly, forming a complex with HIV genomic RNA and pr55gag (10) in the membrane of infected cells. Both the overexpression and the depletion of hStau1 affect the multimerization of pr55gag (8). In this report we have analyzed the possible function of the hStau1 protein during influenza virus infection. We describe the association of hStau1 not only with the NS1 protein but also with the viral RNP. Both mRNAs and vRNAs were found associated to hStau1 complexes *in vivo*. In addition, by using cells in which the expression levels of hStau1 have been reduced by silencing,

^{*} Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional Biotecnología (CSIC), Darwin 3, Campus Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. Phone: 34 91 585 45 57. Fax: 34 91 585 45 06. E-mail: jortin@cnb.csic.es.

[†] Present address: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (ISCIII), Melchor Fernández Almagro 3, Madrid, Spain.

[▽] Published ahead of print on 26 May 2010.

we show that the viral yields and the formation of extracellular virions are reduced, although the expression and the nucleocytoplasmic transport of the viral proteins are not affected.

MATERIALS AND METHODS

Biological materials. The HEK293T (13), A549 (24), BHK21, and MDCK (18, 23) cell lines were cultured as previously described. Plasmid pChStaufen-TAP, expressing the recombinant Staufen-TAP protein, and the control plasmid pC-TAP have been described previously (54). The plasmids pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA, pCMV-NP, pHHNS1, and pHHDeINS1, used to reconstitute functional RNPs, have been described previously (18, 20). The influenza virus WSN and deINS1 strains were used for low-multiplicity-of-infection (MOI) and high-MOI assays, respectively. Vesicular stomatitis virus (VSV) was used as an unrelated control virus. Antibodies specific for hStau1 (38), NP and NS1 (37), M1 and M2 (4, 46), PB1 (45), and PA and PB2 (3, 42) have been described previously. The commercial antibody against human β -actin was purchased from Sigma.

Plasmid construction. The plasmid pRMut1 containing the mutant hStau1 protein was obtained by site-directed mutagenesis of the plasmid pRHST (38) using oligonucleotides 5'-GGCATTTCCTTTGAAATCGCCGCGCTTTTCCCTTACACCTTCCCC-3' and 5'-GGGGAAGGTGAAGGGAAGGCGCGGC GATTTCAAAGAAAATGCC-3'. Lysines 129 and 130 in the third RNA binding domain (RBD) were mutated to alanines using the site-directed mutagenesis kit from Stratagene, as recommended by the manufacturer. To generate the pChStaufen-Mut1-TAP, the fragment containing the coding sequence for hStau1-Mut1 was amplified by PCR using the oligonucleotides 5'-ATGAACTTGGAAAAACCAATGTATAAGCCTGTTGACCTTACTCTCGGATG CAGTC-3' and 5'-TAGCCCTCTCGAGTCAGCACCTCCACACACAGAC ATT-3'. The purified fragment was further cloned into the EcoRV site of the pC-TAP plasmid (54). The plasmid pSR-puro-iStau1 was generated by cloning the sequence 5'-TTTGCCCTTGAACGGACACTTAA-3', specific for hStau1, into the HindIII/EcoRI sites of the pSR-puro plasmid (Oligoengine). Plasmid pSR-puro-Tm, which contains the sequence 5'-CAATTCTCCGAACGTGTCA CGT-3' from *Thermotoga maritima* (Qiagen), which is not expressed in HEK293T cells, was a gift from R. Alfonso-Dunn.

Generation of iStau cell lines. HEK293T cells were transfected with pSR-puro-iStau1 or pSR-puro-Tm plasmids. One day posttransfection, cells were diluted and grown in the presence of 2 μ g/ml of puromycin until independent clones were available for isolation. The individual clones were amplified until the hStau1 protein levels could be determined by Western blotting and an immunofluorescence assay. Two of the analyzed clones presented levels of hStau1 protein lower than that in the parental HEK293T cell line: clone 1-4 and clone 1-8. Cultured cells were further maintained with 4 μ g/ml puromycin.

Transfection-infection. HEK293T cells were used to perform transfection-infection experiments. Cells were transfected with 20 μ g of pChStau-TAP, pChStaufen-Mut1TAP, or pC-TAP in p150 dishes using the calcium phosphate method (56). Infection was carried out 16 h after transfection, using the influenza virus WSN or deINS1 strain at a multiplicity of 3 to 5 PFU/cell for 6 h.

Viral growth in the HEK293T, iStau, or A549 cell lines was analyzed by low-MOI (10^{-3} PFU/cell) experiments that progressed for 60 h.

siRNA transfection. Cultured A549 cells were transfected independently with 5 nM each small interfering RNA (siRNA): (S1 (s13547), S2 (s13546), and S3 (s13548) specific for hStau1 or an irrelevant siRNA (AM4611) from Ambion, using Lipofectamine (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Transfection was carried out for two consecutive days to increase the silencing efficiency before infection.

Protein expression and purification. The expression of His-thSTL and His-thSTL-Mut1 proteins in *Escherichia coli* was induced by isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, and the recombinant proteins were purified by chromatography on Ni-nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose as previously described (37).

Protein analyses. For protein labeling *in vivo*, cells were washed, incubated for 1 h in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) lacking methionine-cysteine (Met-Cys) and labeled for 1 h at various times postinfection with [35 S]Met-Cys (200 μ Ci/ml) (59). Total protein was recovered in Laemmli sample buffer and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. For TAP purification, cell extracts were obtained by lysis in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 5 mM EDTA, pH 7.5 (TNE), 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol (DTT), human placental RNase inhibitor (HPRI) (40 U/ml), and the complete protease inhibitor cocktail (Roche) for 30 min at 4°C. After centrifugation at 2,500 rpm and 4°C, the supernatant was further centrifuged for 10 min at 10,000 rpm and 4°C. The lysates were incubated with IgG-Sepharose

(Stratagene) for 12 h at 4°C (approximately 5- μ l-bed volume/mg protein). The resin was washed 10 times with 10 resin volumes of IPP-150 buffer (54) and five times in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT. The complexes bound to the resin were digested with 1 U of tobacco etch virus protease per 10^7 cells for 3 h at room temperature. The supernatant was mixed with five washes of the resin with IPP150-CBB buffer (54) and incubated with calmodulin-agarose resin for 12 h at 4°C. The resin was washed 10 times in IPP150-CBB buffer and eluted in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% NP-40, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM imidazol, and 3 mM EGTA. In the indicated experiments, 20 μ g of RNase A (Fermentas, Ontario, Canada) was added during cell lysis. The purified proteins were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting.

For immunofluorescence experiments, cells were fixed for 20 min in PBS containing 4% paraformaldehyde and permeabilized for 5 min in PBS containing 0.5% Triton X-100. After blocking in PBS containing 20% fetal bovine serum (FBS) and 0.5% Tween 20, cells were incubated with the corresponding primary antibodies diluted in PBS-0.2% BSA for 1 h. After washing with PBS, the preparations were further incubated with goat anti-rabbit, goat anti-mouse, or goat anti-rat antibodies bound to Alexa 488 and/or Alexa 594 fluorochromes. The preparations were mounted in Prolong reagent and analyzed by confocal microscopy using a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system on a Zeiss Axiovert 200 microscope. Images of 1,024 by 1,024 pixels and an eight-bit gray-scale depth were acquired sequentially every 0.2 to 0.3 μ m employing LaserSharp v5.0 software (Bio-Rad) and analyzed using LaserPix v.4 image program (Bio-Rad). The colocalization mask was used for colocalization analysis. All experiments were repeated at least three times, and a representative experiment is shown.

RNA binding activity assay. To determine the RNA binding activity of wild-type hStau1 and Mut1 proteins, a Northwestern assay was performed with purified proteins separated on 10% polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose filter. The filter was hybridized using a probe corresponding to the 3' UTR of bicoid mRNA (32), as described previously (25).

RNA analyses. The RNA associated to hStau1-TAP was obtained from the purified complexes by proteinase K (0.2 mg/ml) and 0.5% SDS treatment in TNE buffer for 30 min at 37°C. After phenol extraction, RNAs were precipitated with 2 ethanol volumes and 20 μ g of glycogen. Semiquantitative RT-PCR for NP and M segments was performed to determine the presence of vRNA or mRNAs. To detect the NP segment, the oligonucleotides 5'-TGGAATTGGACGATTCTA CAT-3' and 5'-TCTTAGGATCTTCCCGC-3' were used, respectively. To detect the M segment, the primers used were 5'-CTCATGGAATGGCTAAAG ACA-3' and 5'-GCATTTTGGACAAAGCGTCTA-3', respectively. The reverse transcription (RT) reaction was performed in the presence of the corresponding oligonucleotide for 30 min at 42°C. After that time, the reaction mix was incubated 2 min at 94°C to inactivate the AMV enzyme, and the second oligonucleotide was included in the mixture for 30 PCR rounds of 94°C for 30 s, 53°C (for NP segment) or 50°C (for M segment) for 30 s, and 68°C for 30 s and a final extension time of 7 min at 68°C. Serial dilutions of total RNA and the associated RNAs were used to ensure amplification in the linear range.

Purification of virions. Low (10^{-3} -PFU/ml) multiplicities of infection were performed for 60 h in each cell line, and the culture supernatants were centrifuged over a 33% to 50% sucrose step gradient in TNE for 60 min at 40,000 rpm and 4°C in an SW41 rotor. The 50% to 33% interface was collected, diluted in the same buffer, and further centrifuged through a 33% sucrose cushion for 60 min at 40,000 rpm and 4°C in an SW41 rotor, as previously described (20). To determine the protein composition, the pellet was resuspended in Laemmli sample buffer and analyzed by Western blotting. To analyze RNA content, pellets were resuspended in 1 ml of TRIzol reagent (Invitrogen), and the RNA extraction procedure was followed as suggested by the manufacturer. RNA was analyzed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining as previously described (30).

RESULTS AND DISCUSSION

Human Stau1 interacts with NS1 and viral RNPs. Previous results in our laboratory have shown the interaction of endogenous hStau1 with NS1 protein during influenza virus infection (17). In order to verify this interaction, protein localization analyses were performed using antibodies specific for NS1 and hStau1 in HEK293T cells. As shown in Fig. 1A, both proteins colocalized from early times in the cytoplasm of the infected cells. Although the overexpression of NS1 and hStau1 was

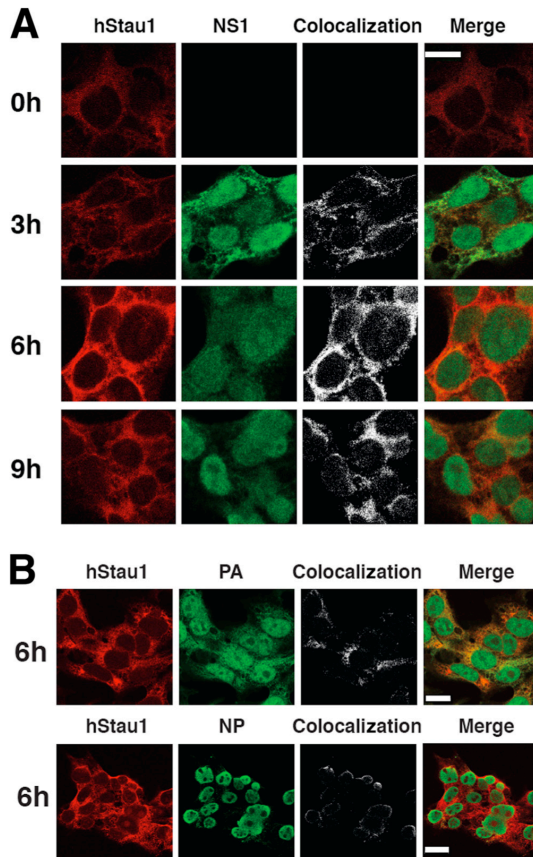


FIG. 1. Colocalization of hStau1 protein with influenza viral proteins in infected cells. Cultures of HEK293T cells were infected with WSN virus and fixed at the times after infection indicated. The cells were processed for immunofluorescence with antibodies specific for the hStau1, NS1, NP, or PA proteins as indicated in Materials and Methods. The left columns of panels show the localization pattern of each protein. The right columns of panels show the colocalization sites of hStau1 and the viral markers used, as well as the merged images. (A) hStau1 protein is shown in red, and NS1 protein in green. The scale bar represents 10 μ m. (B) hStau1 is shown in red, and either PA or NP is shown in green. The scale bar represents 20 μ m.

shown to cause the relocation of the latter to the nucleus (17), we did not observe such an effect in the infection, probably due to the lower concentration of free soluble endogenous hStau1 protein in the cytosol. Furthermore, both proteins colocalized in the cytosol when cells were transfected with plasmids expressing NS1 and hStau1 under an RNA polymerase II promoter (data not shown). In addition, both NP and PA proteins were also found to colocalize with hStau1 in the cytoplasm (Fig. 1B). This result strongly suggests that hStau1 is interacting with viral RNPs, as most of the NP found in the cytosol later in the infection is assumed to be in the form of RNPs.

To verify the interaction of hStau1 with viral RNPs during

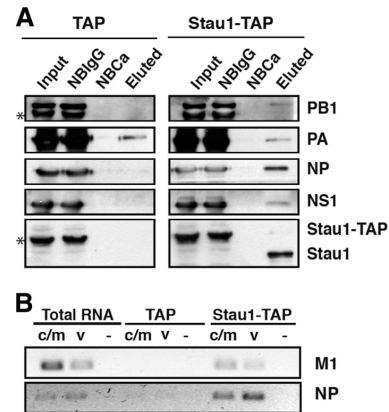


FIG. 2. Association of viral proteins and RNAs with the recombinant hStau1-TAP protein in infected cells. Cultures of HEK293T cells were transfected with a plasmid expressing the hStau1-TAP protein or the TAP tag as a control and subsequently infected with WSN virus at an MOI of 5 PFU/cell. At 6 h postinfection, total cell extracts were prepared and used for TAP purification as indicated in Materials and Methods. (A) Aliquots of the total extract (Input), material not bound to IgG-Sepharose resin (NBIgG), material not bound to calmodulin resin (NBCa), and material eluted from the calmodulin resin (Eluted) were analyzed by Western blotting with antibodies specific for PB1, PA, NP, NS1, and hStau1, as indicated on the right. The asterisks on the left indicate the band of hStau1-TAP, which cross-reacts with rabbit antisera. (B) Total RNA was isolated from the cell extracts of the eluted fractions, and RT-PCR was performed with primers specific for M1 and NP RNAs of positive (c/m) or negative (v) polarity. Ten-fold serial dilutions of the RNAs were analyzed until the PCR signal for the TAP control was negligible. As a negative control, the primers were omitted in the RT reaction step (–) but were included in the PCR step.

the infection, HEK293T cells were transfected with the pChStaufen-TAP or the pCTAP constructs using the calcium phosphate protocol (56). Sixteen hours later, the cells were infected at a high multiplicity with the WSN strain of influenza virus for 6 h, and total cell extracts were used for TAP purification. In agreement with previous results (17), NS1 protein was found in the final TAP elutions obtained from cells transfected with the pChStaufen-TAP plasmid, while there was no detectable NS1 protein in the elutions obtained from cells transfected with control pCTAP plasmid (Fig. 2A). Furthermore, NP, PB1, and PA proteins were also found associated to purified hStau1 derived from cells expressing hStau1-TAP (Fig. 2A), although a substantial background signal of PA appears in the corresponding TAP elution due to unspecific binding to the resin.

Binding of viral RNAs to hStau1 is not direct and does not depend on NS1 protein. The association of NP and polymerase subunits to purified hStau1 suggested its interaction with progeny viral RNPs and hence an association to vRNA would be predicted. Nevertheless, the presence of viral mRNAs in hStau1 complexes could not be excluded, as viral mRNAs are structurally similar to cellular ones, and hStau1 complexes are involved in transport and translation of cellular mRNAs (34, 54). To clarify this question, RNA was obtained from TAP-purified hStau1 or control complexes and used for the detec-

tion of both viral mRNAs and vRNAs corresponding to the early-expressed NP segment and the late-expressed M segment. As presented in Fig. 2B, both mRNAs and vRNAs specific for these viral RNA segments were found in hStau1 complexes, suggesting a dual role of hStau1 in influenza virus infection.

It is known that *D. melanogaster* Stauf protein (dmStau) binds specifically, but not necessarily directly, certain cellular mRNAs (50), and double-stranded RBD3 (dsRBD3) and dsRBD4 have been shown to bind RNAs with the highest affinity (55). Mutagenesis experiments with dmStau and the determination of the dsRNA-RBD3 atomic structure (44) revealed the importance of the lysine residues at positions 129 and 130 in dsRNA-RBD3 to preserve the RNA binding activity. To test whether viral RNAs bind directly to hStau1, we generated a mutant protein in which lys129 and lys130 have been mutated to alanines (hStau1-Mut1). The RNA binding activity of wild-type (wt) and mutant proteins was determined by Northwestern assays using wt and hStau1-Mut1 proteins purified after expression in *E. coli* (Fig. 3A). These results showed that hStau1-Mut1 binds RNA much less efficiently than wt hStau1. Direct *in vitro* RNA binding assays indicated that the affinity of hStau1-Mut1 binding for RNA was around 10 times lower than wt hStau1 (data not shown). Therefore, we used the pChStau-Mut1-TAP construct to perform transfection-infection and TAP purification experiments similar to those described above. Western blot analyses of purified hStau1-Mut1 complexes showed the association of the NS1 protein (Fig. 3B), corroborating that the interaction of NS1 and hStau1 is not mediated by binding to the same RNA molecule (17). In addition, the NP and polymerase subunits were also found associated to hStau1-Mut1 protein (Fig. 3B). Consistent with these observations, vRNAs specific for NP and M1 RNA segments were found associated to purified hStau1-Mut1 complexes (Fig. 3C). In addition, the association of viral mRNAs was also maintained for the hStau1-Mut1 protein, suggesting that neither viral mRNAs nor genomic vRNAs are directly bound to hStau1, but are to another component of the complex.

It has been shown previously that in influenza virus-infected cells, the NS1 protein interacts with viral translation complexes (7) and viral transcription-and-replication complexes (39). Since the results mentioned above suggest that hStau1 interacts with the viral RNP, it is conceivable that NS1 could be responsible for this association. To explore this possibility, we have used delNS1-defective virus (22) to infect cells previously transfected with the pChStaufen-TAP or TAP control constructs. After IgG pulldown and TEV digestion of the intracellular complexes containing hStau1-TAP proteins, the presence of RNP proteins was ascertained. As shown in Fig. 4, NP and PB1 proteins and also the vRNAs were found associated to hStau1, suggesting that NS1 is not necessary for hStau1-RNP interaction. Furthermore, the presence of viral mRNAs in hStau1 complexes suggests that the NS1 protein is not required for the transport of these in hStau1 complexes (Fig. 4B).

This result was corroborated by cotransfection of plasmids expressing PA, PB1, PB2, NP, and plasmid pHHdelNS, which expresses a NS-virus-like RNA with an almost complete deletion of NS1 (21), and the plasmid expressing hStau1-TAP or the TAP tag alone (Fig. 4C). Cell extracts were used to per-

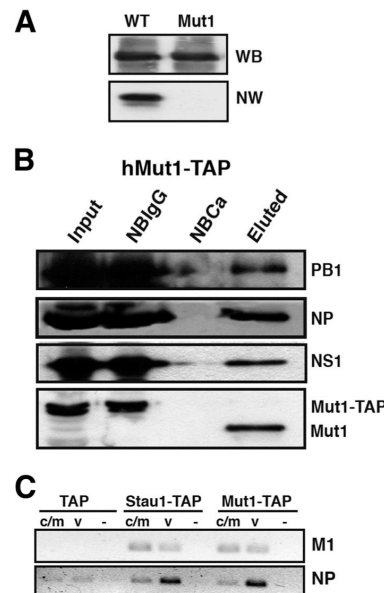


FIG. 3. Role of hStau1 RBD in the interaction with viral RNPs and RNAs. (A) RNA binding activity of wild-type and Mut1 hStau1 proteins. Equal amounts of either protein, as shown by the Western blot (WB) panel, were used to perform a Northwestern (NW) assay using a probe corresponding to the 3' UTR of bicoid mRNA. (B) 293T cells were transfected with the plasmid expressing a mutant hStau1-TAP protein (Mut1-TAP) and infected with the influenza virus WSN strain at 24 h posttransfection. Cell extracts were used to perform TAP purification. Aliquots of the total extract (Input), material not bound to IgG-Sepharose resin (NBIgG), material not bound to calmodulin resin (NBCa), and material eluted from the calmodulin resin (Eluted) were analyzed by Western blotting with antibodies specific for PB1, NP, NS1, and hStau1, as indicated on the right. (C) Total RNA was isolated from the eluted fractions shown in panel B, and RT-PCR was performed with primers specific for M1 and NP RNAs of positive (c/m) or negative (v) polarity. Tenfold serial dilutions of the RNAs were analyzed until the PCR signal for the TAP control was negligible. As a negative control, the primers were omitted in the RT reaction step (–) but were included in the PCR step.

form TAP purification, and the proteins were analyzed by Western blotting. The results indicated that these *in vivo* reconstituted RNPs are able to interact with hStau1-TAP independently of the NS1 protein.

Both NP and the polymerase complex are able to interact with Stauf complexes. So far, we have shown the interaction of hStau1 with the genomic vRNPs. However, these experiments could not identify which element in the RNP is responsible for the interaction. To analyze this issue, we reconstituted wt NS RNPs in HEK293T cells by cotransfection of plasmids expressing PB1, PB2, PA, NP, and pHHNS, as well as the plasmid expressing hStau1-TAP (or the TAP tag as a control). After 24 h, cell extracts were obtained and used to perform TAP purification. Western blot analysis revealed the interaction of the *in vivo* reconstituted RNP with hStau1-TAP (Fig. 5A). Functional activity of the RNP reconstituted *in vivo* is shown by the expression of the NS1 protein (Fig. 5A). This

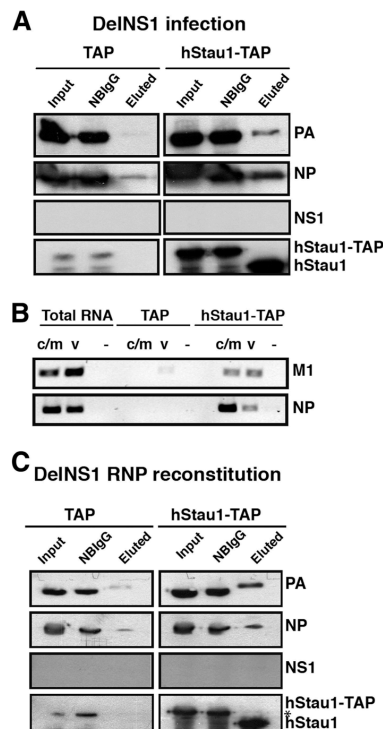


FIG. 4. NS1 protein is not necessary for the interaction of vRNPs and viral mRNAs with hStau1-TAP. Cultures of HEK293T cells were transfected with a plasmid expressing hStau1-TAP protein or the TAP tag as a control and subsequently infected with the deINS1 virus strain at an MOI of 2 PFU/cell. At 6 h postinfection, total cell extracts were prepared and used for TAP purification as indicated in Materials and Methods. (A) Aliquots of the total extract (Input), material not bound to IgG-Sepharose resin (NB1gG), and material eluted from the IgG-Sepharose resin (Eluted) were analyzed by Western blotting with antibodies specific for PA, NP, NS1, and hStau1, as indicated on the right. (B) Total RNA was isolated from the cell extracts or the eluted fractions, and RT-PCR was performed with primers specific for M1 and NP RNAs of positive (c/m) or negative (v) polarity. Tenfold serial dilutions of the RNAs were analyzed until the PCR signal for the TAP control was negligible. As a negative control, the primers were omitted in the RT reaction step (–) but were included in the PCR step. (C) Cultured 293T cells were cotransfected with the plasmid expressing hStau1-TAP protein or the TAP tag and the plasmids necessary to reconstitute an active vRNP in the absence of NS1 protein. TAP purification was performed 24 h posttransfection as described in Materials and Methods. Aliquots of the total extract (Input), material not bound to IgG-Sepharose resin (NB1gG), and material eluted after TEV digestion (Eluted) were analyzed by Western blotting with antibodies specific for PA, NP, NS1, and hStau1, as indicated to the right. The asterisk indicates a cross-reaction of the anti-hStau1 antibody.

result verified the interaction of hStau1 with the RNPs during the infection (Fig. 1 and 2A). To determine whether this interaction requires the functional RNP complex or may occur with any independent element of the RNP, HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing hStau1-TAP (or the TAP tag alone) and the individual RNP components. The results after TAP purification and Western blot analysis are

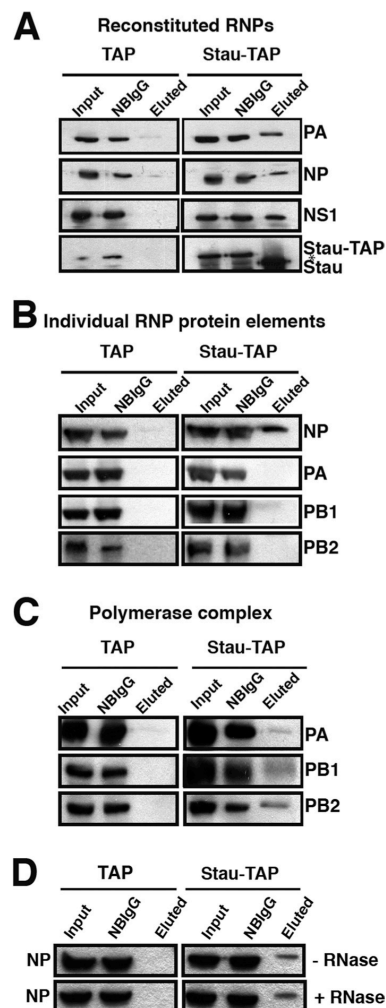


FIG. 5. Influenza virus NP and polymerase complex interact with hStau1 complexes. To determine which viral RNP proteins interact with hStau1, HEK293T cells were cotransfected with the plasmid expressing hStau1-TAP (or the TAP tag as a control) and all plasmids required to generate an active RNP (pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA, pCMV-NP and pHH-NS1) (A), each of the plasmids individually expressing the protein components of the RNP (B), the plasmids expressing the viral polymerase (C), or a plasmid expressing NP (D) (the cell lysis was performed in the presence or absence of RNase A). In every set of experiments, after 24 h posttransfection, cell extracts were used to carry out TAP purification. Aliquots of the total extract (Input), material not bound to IgG-Sepharose resin (NB1gG), and material eluted from the IgG-Sepharose resin (eluted) were analyzed by Western blotting with antibodies specific for PA, PB1, PB2, NP, NS1, and hStau1, as indicated to the right. The asterisk in panel A indicates a cross-reaction of the anti-hStau1 antibody.

shown in Fig. 5B. NP is able to interact with hStau1-TAP, whereas the individual polymerase subunits are not. However, when all the subunits of the polymerase were transfected together with hStau1-TAP to allow the formation of the hetero-

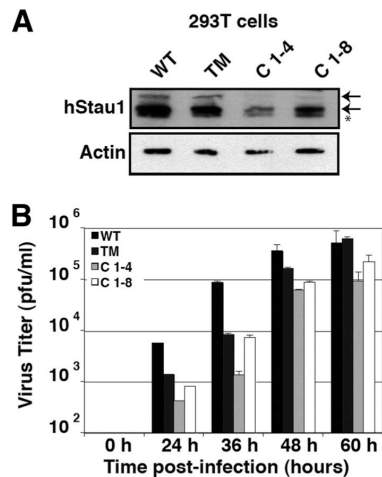


FIG. 6. The yield of influenza virus is reduced in hStau1-silenced HEK293T cells. (A) The levels of hStau1 in WT HEK293T cells, TM clone cells, and the hStau1-silenced cell clones 1-4 and 1-8 were determined by Western blotting using actin as a standard. The two hStau1 isoforms are indicated by arrows, while the asterisk denotes a cross-reaction of the anti-hStau1 antibody. (B) Cultures of HEK293T cells (WT), cells silenced with the irrelevant TM sequence (TM), and the hStau1-silenced clones 1-4 and 1-8 were infected with WSN virus at an MOI of 10^{-3} PFU/cell, and aliquots of the supernatants were sampled at the indicated times after infection. Virus titers and standard deviations are presented, as determined by plaque assay with MDCK cells.

trimeric complex, all subunits were found to associate to hStau1 (Fig. 5C). To analyze whether the interaction of NP and hStau1-TAP was mediated by their binding to the same RNA, 24 h after cotransfection of the hStau1-TAP and NP

plasmids, cell extracts were obtained, divided in two portions, and used to perform TAP purification in the presence or absence of RNase A. As shown in Fig. 5D, this interaction is RNA independent. These results suggest that the association of hStau1 with viral RNPs is mediated by independent interactions with the polymerase complex and the NP monomers.

Relevance of hStau1 in influenza virus infection. To analyze the possible role of hStau1 protein in influenza virus infection, we used gene silencing to generate HEK293T-based cell lines in which hStau1 expression is reduced. The cells were transfected with the plasmid pSR-puro-iStau, which encodes a short hairpin (shRNA) directed to hStau1 mRNA and a puromycin resistance marker. Multiple cell clones were selected by incubation with puromycin, and the levels of endogenous hStau1 were analyzed by Western blot and immunofluorescence assays. Two of them, clones 1-4 and 1-8, showed diminished levels of hStau1 compared to the parental cell line (iStau cells) and were further used for infection experiments (Fig. 6A). As a control, HEK293T cells silenced with an irrelevant sequence derived from *Thermotoga maritima* (iTm cells) were used. Both hStau1 isoforms were silenced (see Fig. 6A, arrows), and the downregulation was around 50% for clone 1-4.

To test whether the presence of hStau1 is important for virus replication, the growth kinetics of the WSN strain of influenza virus was analyzed by low-multiplicity-infection assays, performed in independent but parallel triplicates, with the iStau and control HEK293T cell lines. Titration of the supernatants obtained at various times postinfection showed a close to 10-fold decrease in viral production in iStau clone 1-4 cells (compared to parental HEK293T or iTm-silenced cells) (Fig. 6B). To check whether these reduced virus yields were indeed due to downregulation of hStau1 and could be generalized to any human cell line, we used three different siRNAs specific for

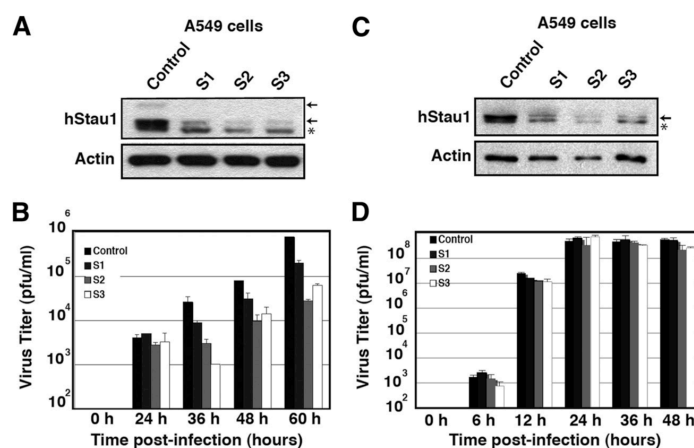


FIG. 7. The yield of influenza virus is specifically reduced in A549 cells. (A) The level of hStau1 in A549 cells transfected with an irrelevant siRNA (control) or with 3 different siRNAs specific for hStau1 (S1, S2, and S3) was determined by Western blotting using actin as standard. (B) Cultures of A549 cells transfected with the siRNAs were infected with WSN virus at an MOI of 10^{-3} PFU/cell, and aliquots of the supernatants were sampled at the indicated times after infection. Virus titers and standard deviations are presented, as determined by plaque assay in MDCK cells. (C) The level of hStau1 was determined as described in the legend for panel A. (D) Cultures of A549 cells transfected with the siRNAs were infected with VSV at an MOI of 10^{-3} PFU/cell, and aliquots of the supernatants were sampled at the indicated times after infection. Virus titers and standard deviations are presented, as determined by plaque assay in BHK21 cells.

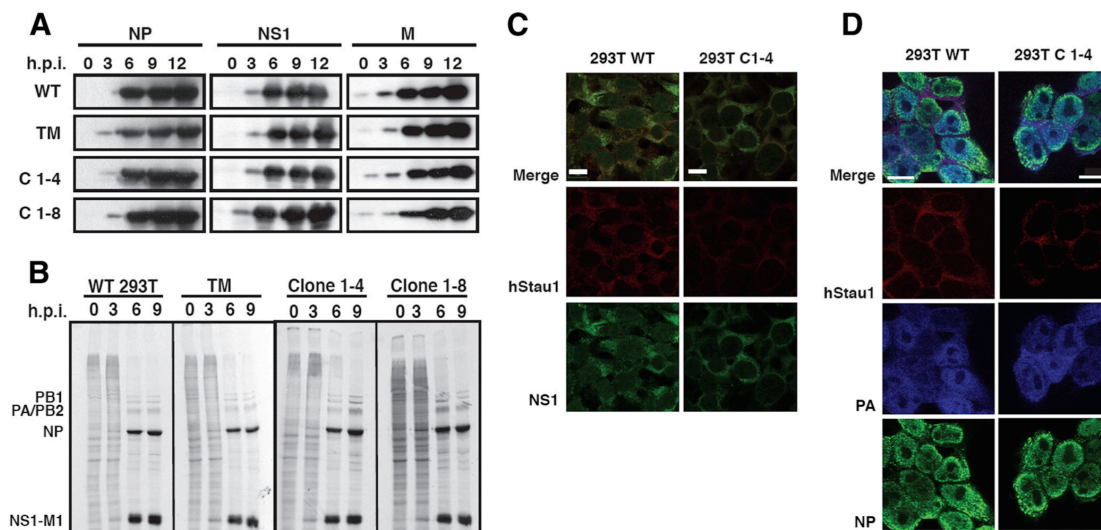


FIG. 8. Protein accumulation, synthesis, and localization after infection of wt and hStau1-silenced cells. Cultures of HEK293T and the hStau1-silenced cells were infected at a high MOI with WSN virus, and total cell extracts were prepared at different times postinfection. (A) The accumulation of viral proteins was determined by Western blotting with antibodies specific for the NP, NS1, and M proteins. (B) The cells were pulse-labeled with [35 S]Met-Cys at the indicated times after infection. The labeled total cell extracts were analyzed by polyacrylamide-gel electrophoresis and autoradiography. The positions of specific virus proteins are indicated on the left. Cultures of HEK293T cells (WT) and the hStau1-silenced clone 1-4 were infected with WSN virus at an MOI of 5 PFU/cell, fixed at 6 h after infection, and processed for immunofluorescence with antibodies specific for hStau1 (in red) and either NS1 (in green) (C) or NP (in green) and PA (in blue) (D). The scale bar represents 10 μ m.

hStau1 to transfect A549 cells and tested the virus production in triplicate low-multiplicity infections. The yield of virus paralleled the hStau1 silencing induced by all three specific siRNAs, compared to the control siRNA (Fig. 7A and B). As a specificity control, we carried out similar experiments but using VSV as an unrelated negative-stranded RNA virus. As presented in Fig. 7C and D, no reduction in virus titers was detected upon silencing of hStau1.

hStau1 silencing does not affect viral protein expression or localization, but production of viral particles is reduced. To determine which step in the viral infection cycle is affected by the reduction in hStau1 levels, silenced or control cells were infected with the WSN strain at a high multiplicity, and the time course of virus proteins NS1, NP, and M1 was determined by Western blotting. The results showed that there are no differences in the accumulation of the viral proteins produced in the iStau cell lines compared to the iTm cell line or the parental HEK293T cell line (Fig. 8A). In addition, similar time courses of virus protein synthesis were examined. At various time points after infection, cells were pulse-labeled with [35 S]Met-Cys, and total protein extracts were analyzed by gel electrophoresis. As shown in Fig. 8B, the viral protein synthesis was not affected by the reduction in hStau1 levels.

As hStau1 colocalizes with both NS1 and viral RNPs from early times in the infection (Fig. 1A and B), it is possible that the reduction in hStau1 levels could affect the nucleocytoplasmic transport of viral proteins, and although their expression is not affected, they could not get out from the nucleus. Localization experiments were performed by using immunofluorescence to

determine the expression pattern of NS1, NP, and PA in the iStau cell lines. As shown in Fig. 8C and D, there were no changes in the nucleocytoplasmic distribution of the viral proteins.

The analyses carried out so far did not reveal any differences in the virus infections of iStau versus iTm or parental HEK293T cells. To test whether the production of virus particles was affected, the supernatants obtained from low-MOI infections of different cell lines were used to purify virions, and these were quantified by Western blotting using antibodies specific for NP and M1 proteins. As presented in Fig. 9A, the yield of viral particles was reduced in the supernatant of A549 cells transfected with siRNAs specific for hStau1 compared to that of the control siRNA-silenced cells. In contrast, the relative accumulations of NP protein in the extracts obtained from the infected cells at the time that the virus was harvested were not substantially different (Fig. 9B), suggesting that fewer virions are generated in hStau1-silenced cells compared to the control-silenced ones. In addition, a comparison of the vRNA contents of virions purified from normal or hStau1-silenced cells did not reveal any misbalance among the different genomic RNA segments (Fig. 9C). In single-cycle experiments performed with the various silenced or control cells, no differences in the shapes of particles obtained were detectable by electron microscopy of stained cellular sections of the infected cells (data not shown). All together, these results suggest that the reduction of virus infectivity described above (Fig. 6 and 7) probably reflects a diminished capacity of hStau1-silenced cells to generate virus particles.

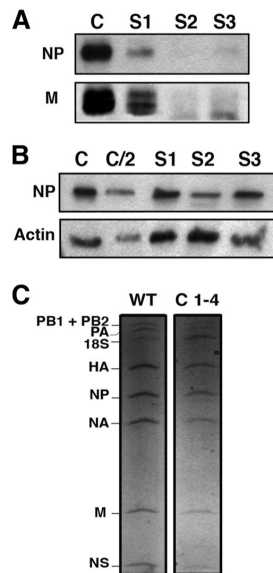


FIG. 9. Production of virus particles in hStau1-silenced cells. Cultures of A549 cells were transfected with 3 different siRNAs specific for hStau1 (S1, S2, and S3) or an irrelevant siRNA as a control (C) and used for low-multiplicity infections with WSN influenza virus. Virus particles were purified from the supernatant media, and total cell extracts were prepared in Laemmli buffer. (A) Equal aliquots of the purified virions were analyzed by PAGE and Western blotting with anti-NP or anti-M1 antibodies. (B) Samples from the cell extracts were analyzed by PAGE and Western blotting with anti-NP (NP) or anti-actin antibodies (Actin). C/2 denotes loading one half the amount than in the control (C). (C) HEK293T cells (WT) and iStau clone 1-4 (C 1-4) cells were infected at a high MOI, and after 7 h, the supernatant was used to purify viral particles. Virion RNAs were purified and analyzed by denaturing polyacrylamide-urea gel electrophoresis and silver staining. The positions of the various RNA segments are indicated on the left.

Possible roles of hStau1 during influenza virus infection. A number of features make influenza virus unusual among RNA-containing viruses infecting animal cells. Its genome is segmented, has negative polarity, and is composed of RNPs rather than naked RNAs. In addition, the replication and transcription of these RNPs occur in the nucleus of the infected cells, but final virion morphogenesis takes place at the plasma membrane (43). All together, these features require the virus to find ways to export the progeny RNPs from the nucleus to the cytoplasm, transport them to the vicinity of the cell membrane, and package a complete set of RNPs into single virions. The results presented above indicate that the hStau1 protein, which was first identified as a human protein associated to the influenza virus NS1 protein (17, 38), also associates to viral RNPs and virus mRNAs in influenza virus-infected cells (Fig. 2A and B). Several recent reports used genomic silencing to identify host genes involved in influenza virus multiplication (5, 31, 35), but the hStau1 gene was not identified as a factor essential for virus replication. In contrast, a general analysis of influenza virus interactors in human cells verified the interaction of hStau1 with NS1 protein (48). This general analysis failed to

reveal the interactions of hStau1 with the virus NP and polymerase showed here but revealed an additional interaction with the M1 protein.

hStau1 is involved in the formation of cytoplasmic RNA granules that mediate the controlled localization and translation of specific cellular mRNAs during differentiation and development (50, 51) but is also present in P bodies and stress granules (2, 52, 53). Therefore, it is possible that hStau1 association to viral mRNAs is connected to their expression and turnover. In fact, it has been reported that hStau1 is involved in the efficient translation of mRNAs containing a structured 5' UTR (14), and NS1 has been described to enhance the translation of viral mRNAs (1, 12, 16). However, no change in the pattern of virus protein synthesis was observed when hStau1 accumulation was downregulated by gene silencing (Fig. 8), consistent with the low structural complexity of influenza virus mRNAs. Hence, we have to conclude that hStau1 is not essential for virus protein expression, at least as detected by the levels of downregulation used.

The association of hStau1 with viral RNPs, and hence with vRNAs, probably represents an additional virus-host interaction, not related to virus RNA replication or transcription, as hStau1 colocalization with RNP markers occurs in the cytoplasm (Fig. 1). Furthermore, this association was found to be independent of the RNA-binding activity of hStau1 and the presence of NS1. Hence, we propose that the association occurs mainly by direct or indirect protein-protein interaction with the polymerase complex and NP (Fig. 5) and could be involved in the localization of the progeny RNPs under the plasma membrane or in the clustering of the various RNP species for efficient packaging, although the analysis of the vRNAs present in virions produced in normal cells or hStau1 knockdown cells failed to show any misbalance among the viral RNA segments (Fig. 9C). It is noteworthy that hStau1 interacts both with NS1 and elements of the virus RNP. It is conceivable that the virus subverts the role of hStau1 to improve the RNP packaging into infectious virus while it also uses hStau1-NS1 interaction for proper mRNA localization and expression.

A precedent of such a role for the hStau1 protein has been reported for HIV-infected cells, as it was shown to become incorporated into HIV virions by interaction with the Pr55gag protein and to regulate the assembly of virus particles (8–10). We have been unable to detect the presence of the hStau1 protein in purified influenza virions by Western blotting (data not shown). Such a negative result is consistent with the data recently published by Shaw et al. (49) on the proteomic characterization of host proteins present in influenza virions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Adolfo García-Sastre for providing the delNS1 virus strain and anti-M antibodies. The technical assistance of Yolanda Fernández, Noelia Zamarreño, and Marcela Benavides is gratefully acknowledged.

S.D.L. is a postdoctoral fellow from FISS, Ministerio de Ciencia e Innovación. J.P. is a fellow from Ministerio de Ciencia e Innovación. R.M.M. was a fellow from Ministerio de Educación y Ciencia. This work was funded by Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2007-60046), Comunidad de Madrid (S-SAL-0815-2006) (VIRHOST), and Fundación Marcelino Botín.

REFERENCES

- Aragón, T., S. de la Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortín, and A. Nieto. 2000. Translation factor eIF4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**:6259–6268.
- Barbee, S. A., P. S. Estes, A. M. Cziko, J. Hillebrand, R. A. Luedeman, J. M. Collier, N. Johnson, I. C. Howlett, C. Geng, R. Ueda, A. H. Brand, S. F. Newbury, J. E. Wilhelm, R. B. Levine, A. Nakamura, R. Parker, and M. Ramaswami. 2006. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**:997–1009.
- Bárcena, J., M. Ochoa, S. de la Luna, J. A. Melero, A. Nieto, J. Ortín, and A. Portela. 1994. Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **68**:6900–6909.
- Bourmakina, S. V., and A. Garcia-Sastre. 2005. The morphology and composition of influenza A virus particles are not affected by low levels of M1 and M2 proteins in infected cells. *J. Virol.* **79**:7926–7932.
- Brass, A. L., I. C. Huang, Y. Benita, S. P. John, M. N. Krishnan, E. M. Feeley, B. J. Ryan, J. L. Weyer, L. van der Weyden, E. Fikrig, D. J. Adams, R. J. Xavier, M. Farzan, and S. J. Elledge. 2009. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* **139**:1243–1254.
- Briedis, D. J., G. Conti, E. A. Munn, and B. W. J. Mahy. 1981. Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cells. *Virology* **111**:154–164.
- Burgui, I., T. Aragón, J. Ortín, and A. Nieto. 2003. PABP1 and eIF4G1 associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**:3263–3274.
- Chatel-Chaix, L., L. Abrahamyan, C. Frechina, A. J. Moulard, and L. DesGroseillers. 2007. The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J. Virol.* **81**:6216–6230.
- Chatel-Chaix, L., K. Boulay, A. J. Moulard, and L. DesGroseillers. 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* **5**:41.
- Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Berialt, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Moulard. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol. Cell. Biol.* **24**:2637–2648.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennis, and J. W. Yewdell. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* **7**:1306–1312.
- de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso, and J. Ortín. 1995. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.* **69**:2427–2433.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**:379–387.
- Dugré-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Moulard, and L. DesGroseillers. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of the RNAs. *Nucleic Acids Res.* **33**:4797–4812.
- Egorov, A., S. Brandt, S. Sereinig, J. Romanova, B. Ferko, D. Kattinger, A. Grassauer, G. Alexandrova, H. Kattinger, and T. Muster. 1998. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* **72**:6437–6441.
- Enami, K., T. A. Sato, S. Nakada, and M. Enami. 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virol.* **68**:1432–1437.
- Falcón, A. M., P. Fortes, R. M. Marión, A. Beloso, and J. Ortín. 1999. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res.* **27**:2241–2247.
- Falcón, A. M., R. M. Marión, T. Zürcher, P. Gómez, A. Portela, A. Nieto, and J. Ortín. 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J. Virol.* **78**:3880–3888.
- Ferrandon, D., L. Elphick, V. C. Nusslein, and D. St. Johnston. 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**:1221–1232.
- Garaigorta, U., A. M. Falcon, and J. Ortín. 2005. Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J. Virol.* **79**:15246–15257.
- Garaigorta, U., and J. Ortín. 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res.* **35**:4573–4582.
- García-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, and T. Muster. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**:324–330.
- Gaush, C. R., W. L. Hard, and T. F. Smith. 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:931–935.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**:1417–1423.
- González, S., and J. Ortín. 1999. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**:3767–3775.
- Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortín, and D. Jackson. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**:2359–2376.
- Hatada, E., M. Hasegawa, K. Shimizu, M. Hatanaka, and R. Fukuda. 1990. Analysis of influenza A virus temperature-sensitive mutants with mutations in RNA segment 8. *J. Gen. Virol.* **71**:1283–1292.
- Herz, C., E. Stavnezer, R. M. Krug, and T. Gurney. 1981. Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell* **26**:391–400.
- Honda, A., J. Mukaigawa, A. Yokoiyama, A. Kato, S. Ueda, K. Nagata, M. Krystal, D. P. Nayak, and A. Ishihama. 1990. Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem.* **107**:624–628.
- Jorba, N., S. Juarez, E. Torreira, P. Gastaminza, N. Zamarreno, J. P. Albar, and J. Ortín. 2008. Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**:2077–2088.
- Karlas, A., N. Machuy, Y. Shin, K. P. Pleissner, A. Artarini, D. Heuer, D. Becker, H. Khalil, L. A. Ogilvie, S. Hess, A. P. Maurer, E. Muller, T. Wolff, T. Rudel, and T. F. Meyer. 2010. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**:818–822.
- Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortín, and C. G. Dotti. 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* **19**:288–297.
- Kochs, G., I. Koerner, L. Thiel, S. Kothlow, B. Kaspers, N. Ruggli, A. Summerfield, J. Pavlovic, J. Stech, and P. Staeheli. 2007. Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J. Gen. Virol.* **88**:1403–1409.
- Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* **10**:2945–2953.
- König, R., S. Stertz, Y. Zhou, A. Inoue, H. H. Hoffmann, S. Bhattacharyya, J. G. Alamares, D. M. Tscherne, M. B. Ortigoza, Y. Liang, Q. Gao, S. E. Andrews, S. Bandyopadhyay, P. De Jesus, B. P. Tu, L. Pache, C. Shih, A. Orth, G. Bonamy, L. Miraglia, T. Ideker, A. Garcia-Sastre, J. A. Young, P. Palese, M. L. Shaw, and S. K. Chanda. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**:813–817.
- Lu, Y., M. Wambach, M. G. Katze, and R. M. Krug. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**:222–228.
- Marión, R. M., T. Aragón, A. Beloso, A. Nieto, and J. Ortín. 1997. The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic Acids Res.* **25**:4271–4277.
- Marión, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortín. 1999. A human sequence homologue of staufen is an RNA-binding protein that localizes to the polyosomes of the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2212–2219.
- Marión, R. M., T. Zürcher, S. de la Luna, and J. Ortín. 1997. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J. Gen. Virol.* **78**:2447–2451.
- Mibayashi, M., L. Martinez-Sobrido, Y. M. Loo, W. B. Cardenas, M. Gale, Jr., and A. Garcia-Sastre. 2007. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J. Virol.* **81**:514–524.
- Nemeroff, M. E., S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller, and R. M. Krug. 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* **1**:991–1000.
- Ochoa, M., J. Bárcena, S. de la Luna, J. A. Melero, A. R. Douglas, A. Nieto, J. Ortín, J. J. Skehel, and A. Portela. 1995. Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res.* **37**:305–315.
- Palese, P., and M. Shaw. 2006. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1647–1689. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Ramos, A., P. Bayer, and G. Varani. 1999. Determination of the structure of the RNA complex of a double-stranded RNA-binding domain from Drosophila Staufen protein. *Biopolymers* **52**:181–196.
- Resa-Infante, P., N. Jorba, N. Zamarreno, Y. Fernandez, S. Juarez, and J. Ortín. 2008. The host-dependent interaction of alpha-importins with in-

- fluenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS One* **3**:e3904.
46. Salvatore, M., C. F. Basler, J. P. Parisien, C. M. Horvarth, S. Bourmakina, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, and A. García-Sastre. 2002. Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J. Virol.* **76**:1206–1212.
 47. Satterly, N., P. L. Tsai, J. van Deursen, D. R. Nussenzweig, Y. Wang, P. A. Faria, A. Levay, D. E. Levy, and B. M. Fontoura. 2007. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:1853–1858.
 48. Shapira, S. D., I. Gat-Viks, B. O. Shum, A. Dricot, M. M. de Grace, L. Wu, P. B. Gupta, T. Hao, S. J. Silver, D. E. Root, D. E. Hill, A. Regev, and N. Hacohen. 2009. A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* **139**:1255–1267.
 49. Shaw, M. L., K. L. Stone, C. M. Colangelo, E. E. Gulcicek, and P. Palese. 2008. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* **4**:e1000085.
 50. St. Johnston, D., D. Beuchle, and C. Nusslein-Volhard. 1991. *staufer*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**:51–63.
 51. St. Johnston, D., and C. Nusslein-Volhard. 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**:201–219.
 52. Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G. L. Boccaccio. 2005. Staufer recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol. Biol. Cell* **16**:405–420.
 53. Thomas, M. G., L. J. Tosar, M. A. Desbats, C. C. Leishman, and G. L. Boccaccio. 2009. Mammalian Staufer 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* **122**:563–573.
 54. Villacé, P., R. M. Marión, and J. Ortín. 2004. The composition of Staufer-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **32**:2411–2420.
 55. Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers. 1999. Mammalian Staufer is a double-stranded RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2220–2227.
 56. Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub, and L. Chasin. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:1373–1376.
 57. Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay, and P. Digard. 2009. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J. Virol.* **83**:8021–8031.
 58. Wolff, T., R. E. O'Neill, and P. Palese. 1998. NS1-binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J. Virol.* **72**:7170–7180.
 59. Zürcher, T., R. M. Marion, and J. Ortín. 2000. Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J. Virol.* **74**:8781–8784.

